

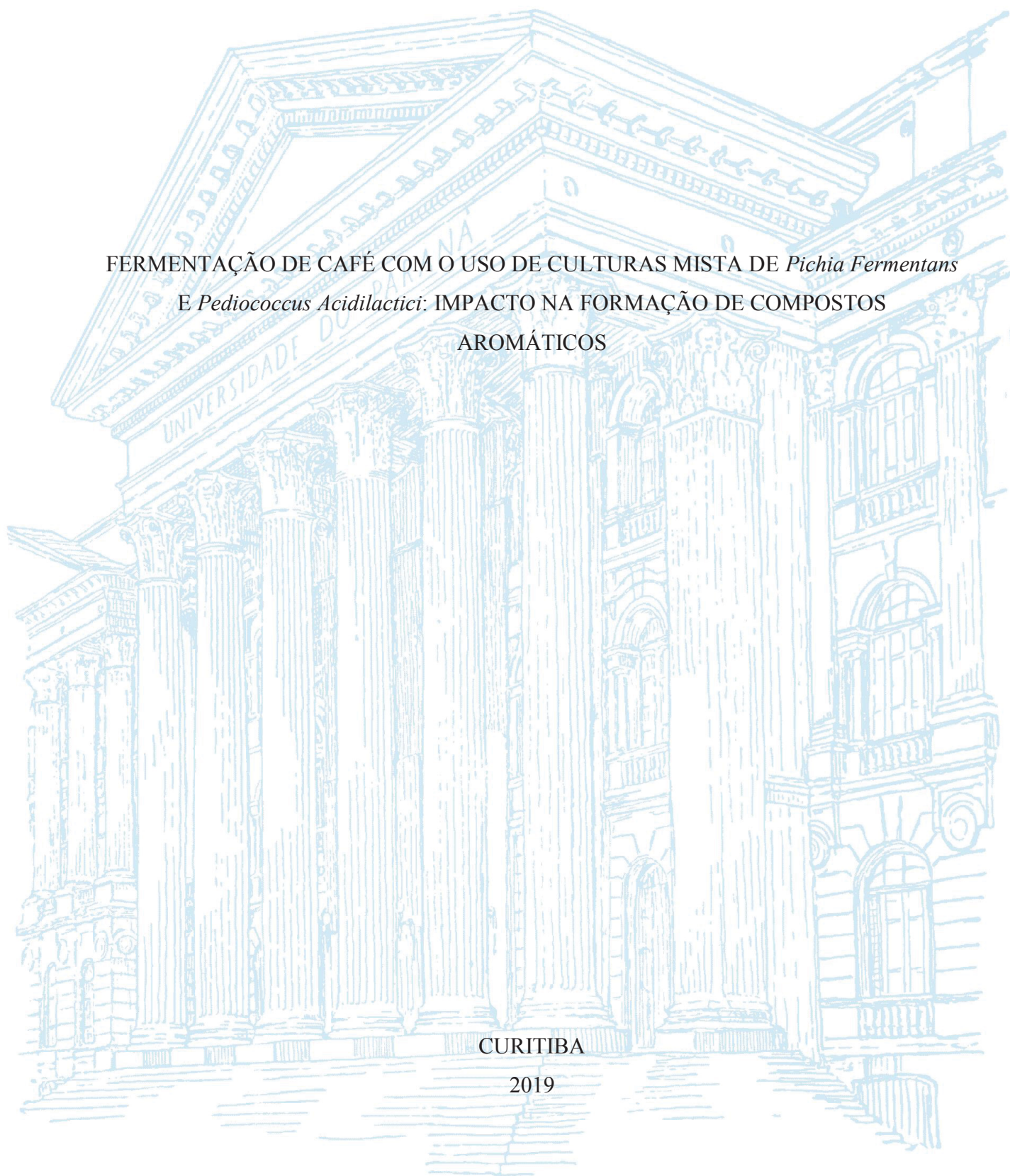
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALEXANDER DA SILVA VALE

FERMENTAÇÃO DE CAFÉ COM O USO DE CULTURAS MISTA DE *Pichia Fermentans*
E *Pediococcus Acidilactici*: IMPACTO NA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS
AROMÁTICOS

CURITIBA

2019



ALEXANDER DA SILVA VALE

FERMENTAÇÃO DE CAFÉ COM O USO DE CULTURAS MISTA DE *Pichia Fermentans*
E *Pediococcus Acidilactici*: IMPACTO NA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS
AROMÁTICOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Gilberto Vinícius de Melo Pereira
Coorientadora: Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

V149f Vale, Alexander da Silva
Fermentação de café com o uso de culturas mista de *Pichia Fermentans* e *Pediococcus Acidilactici*: impacto na formação de compostos aromáticos [recurso eletrônico] / Alexander da Silva Vale – Curitiba, 2019.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Gilberto Vinícius de Melo Pereira

Coorientadora: Vanete Thomaz Soccol

1. Fermentação – Cultura iniciadora. 2. Café – aromas. 3. Voláteis. I. Universidade Federal do Paraná. II. Pereira, Gilberto Vinícius de Melo. III. Soccol, Vanete Thomaz. IV. Título.

CDD: 664.5

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ALEXANDER DA SILVA VALE** intitulada: "**Fermentação de café com o uso de cultura mista de *Pichia fermentans* e *Pediococcus acidilactici*: impacto na formação de compostos aromáticos**", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Maio de 2019.


GILBERTO VINICIUS DE MELO PEREIRA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


SUSAN GRACE KARP
Avaliador Interno (UFPR)


DÃO PEDRO DE CARVALHO NETO
Avaliador Interno Pós-Doc (UFPR)


MÁRIA GIOVANA BINDER PAGNONCELLI
Avaliador Externo (UTFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade dada e pelas pessoas que ele colocou na minha vida.

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e à CAPES pelo apoio financeiro.

Ao professor Doutor Gilberto Pereira, pela paciência na orientação e incentivos que tornaram possível a conclusão desta dissertação. Gostaria de ressaltar a sua disponibilidade e o apoio que sempre demonstrou. Obrigado por acreditar no meu trabalho!

Agradeço a todos os professores e técnicos do PPGEBB.

Gostaria de agradecer aos meus pais, que sempre me apoiaram e me incentivaram a lutar pelos meus sonhos.

A todos meus amigos do PPGEBB pelo apoio. Em especial, Carol e Natânia, vocês foram essenciais nesse processo.

Aos meus amigos, Ian, Murillo, Murielly, Ana, Junior, Mayara, Naize, Italo e Lais. Muito obrigado!

RESUMO

Culturas iniciadoras são definidas como preparações microbianas selecionadas para aumentar a eficiência de processos fermentativos. Na indústria alimentícia, várias culturas microbianas são usadas para garantir a produção de alimentos seguros e de alta qualidade. A fermentação do café é um dos poucos processos realizados de maneira natural sem a adição de culturas microbianas. No primeiro capítulo deste trabalho foi construída uma revisão crítica sobre os efeitos de bactérias do ácido láctico (BAL) sobre a qualidade do café. A atividade de BAL durante o processamento de café auxilia no processo de desmucilagem dos frutos por meio da acidificação da polpa, além de formar metabólitos a partir dos metabolismos de citrato e aminoácidos que agregam qualidade às amêndoas fermentadas. No entanto, o potencial de BAL relacionado à qualidade do café não foi totalmente elucidado e muitos desafios aguardam pesquisa e exploração industrial. Pesquisas futuras devem ser focadas na investigação de novas linhagens de BAL para uso como culturas iniciadoras, bem como na possibilidade de criar culturas mistas com leveduras selecionadas. Até o momento, não foi relatado a utilização de culturas mistas contendo BAL e leveduras para a fermentação do café. Assim, na segunda etapa deste trabalho foi avaliado o perfil de fermentações de café com uso de culturas mistas entre *Pichia fermentans* YC5.2 e *Pediococcus acidilactici* LPBC16. As fermentações foram conduzidas com culturas individuais (*Pichia fermentans* YC5.2 ou *Pediococcus acidilactici* LPBC16) e mistas (*Pichia fermentans* YC5.2 e *Pediococcus acidilactici* LPBC16) utilizando frutos cerejas (maduros) e verdes (imaturos). A introdução de culturas mistas foi mais eficiente no consumo de açúcares (glicose e frutose) e produção de ácido láctico (≥ 1.45 e ≥ 0.63 g/L para frutos maduros e imaturos, respectivamente). Além disso, inoculações com culturas mistas proporcionaram aumentos significativos ($p < 0,05$) na produção de voláteis, tais como etanol e acetato de etila. A inoculação com *P. fermentans* e *P. acidilactici*, tanto nos tratamentos individuais como no tratamento misto, resultou na modulação do perfil de voláteis dos grãos de café. Foram identificados 30 compostos no grão de café maduro. Dentre estes, alguns compostos, como 3-octanol, 2-heptenal, benzaldeído, decanal e D-limoneno, foram identificados somente nas fermentações inoculadas. Como esperado, o grão imaturo apresentou uma menor quantidade de compostos, sendo identificados apenas 19 voláteis. Essa menor produção de voláteis pode estar relacionada com uma menor atividade microbiana devido o estágio de maturação do grão. Portanto, a inoculação da cultura iniciadora mista resultou em um aumento na produção de compostos associados aos metabolismos de BAL e leveduras, evidenciando uma interação metabólica dos microrganismos. Além disso, a utilização de cultura mista resultou em um grão com maior complexidade de compostos aromáticos no final da fermentação.

Palavras chaves: Cultura iniciadora, *Pichia fermentans*, *Pediococcus acidilactici*, voláteis.

ABSTRACT

Starter cultures are defined as selected microbial preparations used to increase efficiency of fermentation processes. In the food industry, numerous microbial cultures are used to ensure the production of safe and high-quality commodities. Coffee fermentation is one of the few processes performed naturally without the addition of microbial cultures. In the first chapter of this work, a critical review on the effects of lactic acid bacteria (LAB) on coffee quality was constructed. The activity of LAB during coffee processing allows in the process of demuciling of the fruits through the acidification of the pulp, in addition to forming metabolites from citrate and amino acids metabolism which add quality to the fermented beans. Undoubtedly, the full potential of coffee related LAB has not been fully determined and many challenges are awaiting research, dissemination and industrial exploitation. Future research should be focused on the investigation of new LAB strains and the possibility of creating multi-purpose mixed cultures with yeast strains. To date, the use of mixed cultures containing LAB and yeast for coffee fermentation has not been reported. Thus, the second stage of this work evaluated coffee fermentation profile using mixed cultures between *Pichia fermentans* YC5.2 and *Pediococcus acidilactici* LPBC16. The fermentations were conducted with individual cultures (*Pichia fermentans* YC5.2 or *Pediococcus acidilactici* LPBC16) and mixed (*Pichia fermentans* YC5.2 and *Pediococcus acidilactici* LPBC16) using cherry (mature) and green (immature) fruits. The introduction of mixed cultures was more efficient in the consumption of sugars (glucose and fructose) and lactic acid production (≥ 1.45 and ≥ 0.63 g / L for mature and immature fruits, respectively). In addition, inoculation with mixed cultures provided a significant increase ($p < 0.05$) in the production of volatiles, such as ethanol and ethyl acetate. This intense microbial activity resulted in the modulation of the volatiles profile of the coffee beans. Twenty-nine compounds were identified in the mature coffee bean. Among these, some compounds, such as 3-octanol, 2-heptenal, benzaldehyde, decanal and D-limonene, were identified only in the inoculated fermentations. As expected, the immature grain presented a smaller amount of compound, with only 19 volatiles identified. This lower production of volatiles may be related to a lower microbial activity due to the maturation stage of immature grain. Therefore, the inoculation of mixed starter culture resulted in an increase in the production of compounds associated with LAB and yeast metabolisms, evidencing a metabolic interaction of the microorganisms. In addition, the use of mixed culture generated beans with higher complexity of aroma compounds at the end of the fermentation.

Keywords: Starter culture, *Pichia fermentans*, *Pediococcus acidilactici*, volatiles.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 OBJETIVO GERAL	3
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2 CAPÍTULO 1: BACTERIAS DO ÁCIDO LÁCTICO: O QUE A INDÚSTRIA DE CAFÉ DEVERIA SABER	4
2.1 INTRODUÇÃO	4
2.2 PROCESSAMENTO DO CAFÉ	5
2.3 ECOLOGIA E DIVERSIDADE DE BAL NO PROCESSAMENTO DO CAFÉ	5
2.4 METABOLISMO DE BAL NA FERMENTAÇÃO DO CAFÉ	8
2.5 IMPACTO NA EFICIÊNCIA DO PROCESSO E QUALIDADE DA BEBIDA	10
2.6 GENÔMICA FUNCIONAL	14
2.7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	14
3 CAPÍTULO 2: EFEITO DA CO-INOCULAÇÃO COM <i>Pichia fermentans</i> E <i>Pedioccus acidilactici</i> NOS METABOLITOS PRODUZIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO E COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO GRÃO DE CAFÉ	16
3.1 INTRODUÇÃO	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 EXPERIMENTOS EM CAMPO	17
4.2 AMOSTRAGEM E MEDIÇÃO DE PH	18
4.3 ANÁLISE POR HPLC DA FERMENTAÇÃO DA POLPA DE CAFÉ	18
4.4 ANÁLISE POR GC DA POLPA DE CAFÉ EM FERMENTAÇÃO	18
4.5 ANÁLISE GC/MS DE GRÃOS DE CAFÉ FERMENTADOS	19
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 EXPERIMENTOS EM CAPO	19
5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE GRÃOS DE CAFÉ	23
6 CONCLUSÃO	29
7 REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e em termos financeiro é classificado como a segunda maior commodity do planeta (Lee et al., 2015). Além disso, o consumo de café aumentou a uma taxa média anual de 1,9% nos últimos 50 anos (Sepúlveda et al., 2016). A *International Coffee Organization* (ICO, 2019) estimou uma produção aproximada de 164,99 milhões de sacas de 60 kg para os anos de 2018/19. Dentre os principais consumidores de café se destacam os países da União Europeia, Ásia e Oceania, América do Norte, América do Sul, África, América Central e México respectivamente. Na Europa foi observado um aumento no consumo de cerca de 1,5% comparado com o ano 2016/17. Contudo, o maior aumento no consumo de café foi observado nos países da Ásia e Oceania, cerca de 4,4% (ICO, 2019).

Impulsionado pelo crescente consumo de café, principalmente pelos Estados Unidos, União Europeia e Ásia, tem se notado um aumento na procura por cafés especiais ou “specialty coffee” (Wilson & Wilson 2014). Segundo a *Specialty Coffee Association of America* (SCAA, 2016), para um café ser considerado especial ele deve ser cultivado em regiões e climas ideais, além de apresentar aromas e sabores característicos sem a presença de defeitos. Contudo, a produção dos cafés especiais necessita de um trabalho conjunto e harmonioso de toda a cadeia de produção, uma vez que a qualidade do café é moldada desde o plantio até os processamentos pós-colheita (Donnet et al., 2008; Tolessa et al., 2017; Pereira et al., 2019).

O processamento pós-colheita é uma etapa crucial na remoção da pele, polpa e mucilagem do grão de café, além de atribuir sabor e aromas característicos na bebida. O processamento pode ser realizado por três métodos diferentes, conhecidos como seco, semi-seco ou úmido. Dentre os três métodos de processamento, a via úmida tem se destacado devido a produção de um café de alta qualidade. Os cafés processados por via úmida apresentam maior acidez e mais aromas do que os cafés processados pelo método seco e semi-seco (Mazzafera & Purcino, 2004). Durante o processamento por via úmida, ocorre diversas atividades metabólicas dos açúcares e aminoácidos livres no interior do grão de café e estas atividades metabólicas são importantes para formação de diversos compostos voláteis, como furanos, dicetonas, pirazinas, lactonas e ácidos fenólicos (Bytof et al., 2005). Uma limitação na fermentação úmida é que no campo o processo ocorre em tanques abertos de cimento, o que facilita a contaminação por uma microbiota natural não desejada (Pereira, Soccol, Brar, Neto, & Soccol, 2017).

Portanto, ainda hoje, a fermentação do café ocorre de forma espontânea, mas diversos estudos têm demonstrado que a fermentação do café precisa ser controlada e padronizada a fim de se garantir a prevalência de microrganismos que possam atribuir sabores e aromas especiais (Silva et al., 2014). Uma alternativa para padronização das fermentações de café é a utilização de culturas iniciadoras. Diversas leveduras dos gêneros *Pichia*, *Saccharomyces*, *Candida* e *Yarrowia* foram previamente selecionadas e caracterizadas como potências culturas iniciadoras devido a produção de aromas e sua atividade pectinolítica (Avallone et al., 2002; Silva et al., 2013; Pereira et al., 2014; Pereira et al., 2016; Ribeiro et al., 2017; Lee et al., 2017).

Além de leveduras, as bactérias ácido lácticas (BAL) têm sido utilizadas como culturas iniciadoras. Recentemente, foi relatado que a acidificação do meio pela produção do ácido láctico pode auxiliar na remoção da mucilagem do grão de café (Carvalho Neto et al., 2018, Pereira et al., 2019). Além disso, a fermentação controlada evita a produção de alguns compostos indesejáveis, como o ácido acético, succínico, butírico e propiônico (Pereira et al., 2016).

Recentemente, tem tido um interesse crescente em usar fermentações mistas em vez de cultura única. Fermentações de cultura mista são aquelas em que o inóculo consiste sempre de dois ou mais organismos. Este tipo de fermentação oferece uma série de vantagens sobre fermentações convencionais de cultura única, incluindo maior taxa de crescimento microbiano e rendimento de metabólitos, melhor utilização do substrato e maior proteção contra contaminação (Gaden Jr., Bokanga, Harlander, Hesseltine, & Steinkraus, 1992). Além disso, o uso combinado de diferentes espécies frequentemente resulta em compostos imprevisíveis, o que pode afetar de forma positiva a composição química e aromática dos alimentos fermentados (Ciani, Comitini, Mannazzu, & Domizio, 2010).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de interação entre a inoculação mista de *Pichia fermentans* YC5.2 e *Pediococcus acidilactici* LPBC161 e a modulação química de grãos de café maduros e imaturos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Construir uma revisão de literatura abordando a importância de bactérias do ácido láctico para a fermentação e a qualidade do café.
- Avaliar o consumo de açúcares provenientes da polpa do café.
- Avaliar a produção de ácidos orgânicos.
- Avaliar a produção de compostos voláteis durante a fermentação.
- Avaliar a modulação química dos grãos de café.
- Avaliar a interação metabólica entre a *Pichia Fermentans* e *Pediococcus acidilactici*.

2 CAPÍTULO 1: BACTERIAS DO ÁCIDO LÁCTICO: O QUE A INDÚSTRIA DE CAFÉ PRECISA SABER.

Esse capítulo foi publicado como um artigo científico em 2019 e foi intitulado de “Lactic acid bacteria: What coffee industry should know?” na revista *Current Opinion in Food Science* Available. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.004>.

2.1 INTRODUÇÃO

Bactérias do ácido láctico (BAL) é um grupo microbiano de importância econômica substancial, amplamente utilizado na produção de alimentos fermentados. A definição baseada em metabólitos classifica BAL pela formação de mais de 50% de ácido láctico como produto final da utilização de carboidratos, além de serem bactérias gram-positivas, não móveis e não formadoras de esporos com morfologia de cocobacilos ou bastonetes (Holzapfel e Wood 2014). As BALs pertencem a ordem Lactobacillales, subdivididos em seis famílias (Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae e Streptococcaceae) e 11 gêneros (*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*), de acordo com as suas sequências do gene 16S rRNA (Salveti et al. 2012).

Embora as BALs estejam associadas principalmente a matrizes lácteas, acredita-se que a origem de cepas industriais seja de material vegetal (Cavanagh et al. 2015). A onipresença da BAL na natureza resulta frequentemente em inoculação oportunista de matérias primas alimentares (Narvhus e Axelsson, 2003). No processamento de café, as BALs de múltiplos ecossistemas encontram na polpa do café um ambiente rico para o seu desenvolvimento. Populações acima de 10^8 células/mL metabolizam açúcares e outros constituintes menores presente na polpa do café para formar principalmente ácido láctico, resultando na diminuição do pH. O ácido láctico, por sua vez, auxilia na quebra da pectina, um carboidrato complexo presente em altas concentrações na polpa de café (Avallone et al. 2002). Essas atividades metabólicas auxiliam no processo subsequente de secagem dos grãos de café, causando redução do tempo necessário para o processamento pós-colheita de 21 para 7 dias (Carvalho Neto et al., 2018; Huch e Franz, 2015).

Além da remoção da mucilagem, as BALs têm sido associadas à geração de compostos bioativos relacionados à qualidade do café. A capacidade de formação de sabor de culturas de BALs do tipo selvagem na fermentação de café tem ganho um interesse acrescido devido aos diversos aromas que tais estirpes são capazes de produzir. Alguns metabólitos derivados de BAL, como ésteres, cetonas, álcoois superiores e aldeídos, podem atribuir notas

sensoriais com diferentes percepções florais, frutadas e amanteigadas. Este artigo discute novas direções para explorar a BAL na fermentação de café. Abrange a diversidade, a ecologia, o metabolismo e as principais influências na qualidade do café

2.2 PROCESSAMENTO DO CAFÉ

No mercado internacional, o café é classificado de acordo com a tecnologia de processamento pós-colheita usada para remover as camadas externas aderidas aos frutos: 'café natural', produzido a partir de grãos de café processados na fazenda pelo método simples de secagem ao sol, conhecido como processamento por via seca; e "café lavado", produzido a partir de grãos de café que passam por uma série relativamente complexa de etapas, incluindo despulpamento, fermentação e secagem ao sol, conhecido como processamento por via úmida. E um método alternativo, conhecido como processamento semi-seco, as cerejas despulpadas são secas ao sol e moídas para liberar os grãos verdes. O café originado do processamento semi-seco é denominado "natural descascado" (Pereira et al. 2017).

No processamento úmido, após a colheita e o despulpamento, os grãos de café são depositados em tanques de alvenaria contendo grandes volumes de água. O ambiente microaerófilo e a seletividade nutricional da polpa de café ocasionam o desenvolvimento de microrganismos com metabolismo fermentativo, principalmente levedura e BAL. As atividades microbianas degradam os componentes da mucilagem (açúcares simples, carboidratos complexos e proteínas) e induzem as transformações bioquímicas necessárias para a fermentação natural (Silva et al. 2008). Muitas espécies microbianas foram relatadas na fermentação de grãos de café, compreendendo mais de 80 gêneros, conforme relatado por estudos recentes de microbiomas (Carvalho Neto et al., 2018; De Bruyn et al., 2017; Zhang et al., 2019). Esses grupos microbianos abrigam um notável perfil de fermentação que inclui a produção de compostos aromáticos, enzimas e ácidos orgânicos (Leroy e De Vuyst, 2004; Pereira et al., 2016).

2.3 ECOLOGIA E DIVERSIDADE DE BAL NO PROCESSAMENTO DO CAFÉ

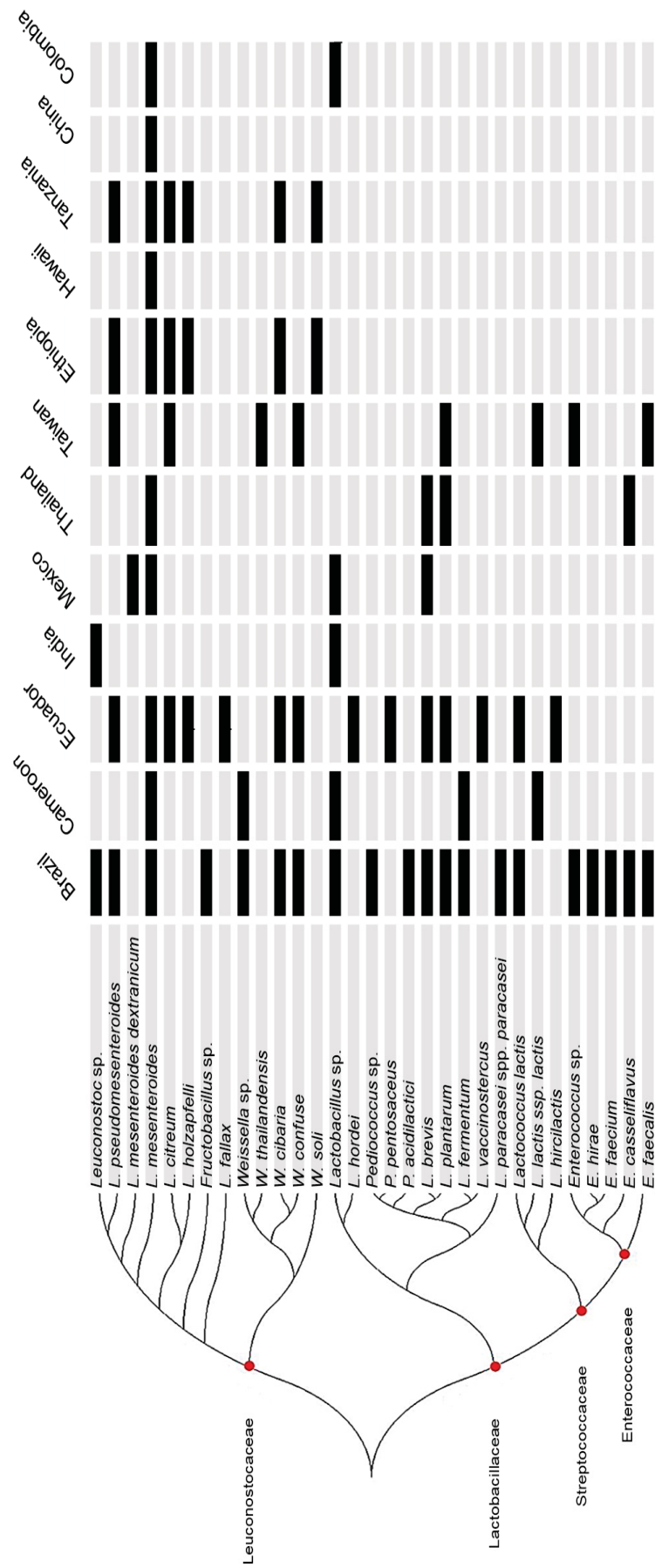
Os primeiros relatos abrangendo a associação de BAL com processamento de café foram fornecidos há 73 anos por (Pederson; Breed 1946). Desde então, as BALs foram reconhecidas como um componente integral do processamento de café na maioria dos países produtores. A relação filogenética das espécies relacionadas ao café é mostrada na (Figura 1). Elas são divididas em quatro famílias (Leuconostocaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae e Enterococcaceae) que ocorrem nos gêneros taxonômicos *Leuconostoc*, *Fructobacillus*,

Weissella, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. É plausível que a BAL que colonize a fermentação do café seja da superfície dos frutos de café. No entanto, o solo, a água, insetos e os equipamentos usados no processamento são fontes potenciais de BAL (Carvalho Neto et al., 2018; Chen et al., 2005; Endo e Salminen, 2013). Após avaliar o processo de fermentação, as BALs rapidamente proliferam e atingem populações de 10^8 células/mL em 20 horas (Avallone et al. 2002). Esse crescimento acentuado está relacionado à adaptabilidade de BAL ao meio ambiente e aos fatores de estresse do processamento do café, como variação do pH, disponibilidade de açúcares e competição com outros microrganismos (Mayo et al. 2010).

Leuconostoc é o gênero microbiano onipresente relatado na fermentação de café dos biomas Brasil, Camarões, Colômbia, China, Equador, Etiópia, Havaí, México, Tailândia e Tanzânia (Figura 1). Abordagens microbiológicas dependentes de cultivo também mostram que *Leuconostoc* é o grupo microbiano mais abundante através do processo de fermentação do café (Avallone et al. 2002). Materiais vegetais (por exemplo, folhas em decomposição, raízes e frutos superprecoces) são habitats ecológicos naturais das espécies de *Leuconostoc* (Hemme e Foucaud-Scheunemann, 2004; Huys et al., 2012). Eles são comumente encontrados em associação com levedura em aplicações domésticas (por exemplo, vinho, cacau e kefir) (Jouhten et al. 2016). A natureza complexa dessa interação é destacada pelas observações de que (i) a autólise de leveduras libera nutrientes, como aminoácidos, polissacarídeos e riboflavina, favoráveis ao crescimento bacteriano (Alexandre e Guilloux-Benatier, 2006; Fleet, 2003), e que (ii) a acidificação do meio de fermentação cria um ambiente propício para o desenvolvimento de leveduras (Pereira et al. 2017). Essas interações positivas mostraram promover os atributos sensoriais desejados ao vinho, sourdough e iogurte. Entretanto, informações sobre esses mecanismos na fermentação do café são escassas.

Outros membros das BALs são comumente encontrados em regiões específicas produtoras de café, como *Lactobacillus hordei*, *L. vaccinostercus*, *Lactococcus hircilactis*, *Leuconostoc fallax* e *Pediococcus pentosaceus* no Equador; *Enterococcus hirae*, *Fructobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *P. acidolactici* e *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* no Brasil; *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* no México; *Lactobacillus fermentum* em Camarões; e *Weissella thailandensis* em Taiwan (Figura 1).

Figura 1: Relação filogenética de espécies BAL relatadas com a fermentação de grãos de café. As seqüências do gene 16S rRNA foram recuperadas do banco de dados GenBank e alinhadas com ClustalW. A árvore filogenética foi construída usando o programa MEGA 4. Blocos negros indicam presença de espécies no referido país, de acordo com os estudos de (Avallone et al., 2002), (Dão Pedro Carvalho Neto et al., 2018b), (De Bruyne et al., 2007), (De Bruyn et al., 2016), (Hamdouché et al., 2016), (Leong et al., 2014), (Muynarsk et al., 2019), (Nasanit and Satayawut, 2015), (Pagnoncelli et al., 2003), (Pederson and Breed, 1946), (Ribeiro et al., 2018), (Schillinger et al., 2008), (Silva et al., 2000), (Velmourougane, 2013), (Vilela et al., 2010), (Zhang et al., 2019).



2.4 METABOLISMO DE BAL NA FERMENTAÇÃO DO CAFÉ

O abundante teor de açúcar presente na polpa de café, incluindo pentoses (xilose, ribose e arabinose), hexoses (glicose, frutose, galactose e manose) e polissacarídeos (pectina e celulose), são fontes primárias de carbono para o crescimento de BAL (Figura 2). Espécies homofermentativas de BAL, como *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosacesus*, *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus hordei*, fermentam açúcares pela via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para piruvato, que é convertido em ácido láctico pela lactato desidrogenase (De Bruyn et al. 2017; Endo; Dicks 2014; Leong et al. 2014; Zhang et al. 2019). No entanto, é possível supor que sob condições de stress relacionadas com o processamento do café (por exemplo, limitação de carbono e ambiente ácido), estas espécies homofermentativas possam mudar para um metabolismo de ácido misto (Mayo et al. 2010).

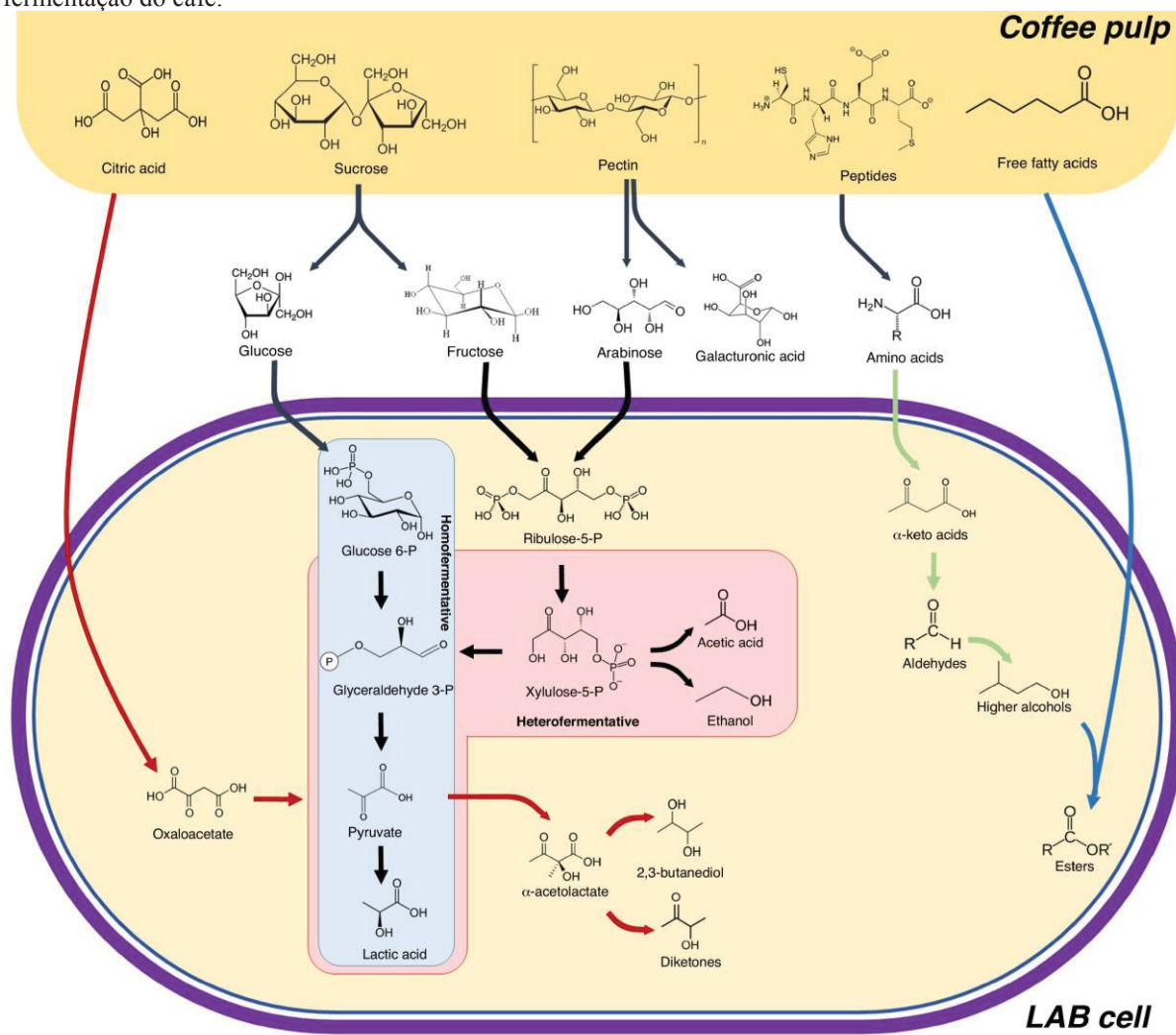
As BALs heterofermentativo, como *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum* e *Lactobacillus brevis*, também são comumente encontrados em fermentações de café (Avallone et al. 2001; De Bruyn et al. 2017; Leong et al. 2014). Estas espécies de BAL são capazes de catabolizar pentoses e hexoses presentes na polpa de café em uma vasta gama de metabólitos finais, incluindo lactato, acetato, CO₂ e etanol, através da via da pentose fosfato (Figura 2). Por fim, BAL são capazes de promover a quebra de carboidratos complexos através da produção de diferentes enzimas hidrolíticas (por exemplo, pectina liase, pectina metilesterase e exo-poligalacturonase) e através do processo de acidificação (Avallone et al. 2002; Silva et al. 2013). A hidrólise da pectina libera açúcares simples (glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e D-galacturonato) como uma fonte adicional de carbono para o crescimento de LAB (Avallone et al. 2000; Pereira et al. 2019).

Além dos açúcares, as espécies BAL têm a capacidade de metabolizar citrato presente em alta concentração na polpa de café (Figura 2). O metabolismo do citrato pela BAL ocorre através de três processos: (i) transporte de citrato, (ii) conversão de citrato em oxaloacetato e (iii) conversão de oxaloacetato em piruvato e CO₂ (García-Quintáns et al. 2008; Hugenholtz 1993). Este processo conduz à produção de compostos aromatizantes com 4 átomos de carbono, incluindo diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol. Além disso, o acúmulo de piruvato em um ambiente ácido, como a polpa de café, favorece a produção de α -acetolactato, um precursor dos compostos de 4 carbonos (Snoep et al. 1992). As espécies de *Leuconostoc* e *Lactococcus* encontradas na fermentação de café são relatadas como acentuado metabolismo de citrato (Drider et al. 2004; Sánchez et al. 2007).

O catabolismo de aminoácidos tem um papel importante na fisiologia das BALs na obtenção de energia em condições limitantes de nutrientes e na participação da homeostase do

pH (Mayo et al. 2010). Além disso, BALs são auxotróficas para um número variável de aminoácidos, dependendo de um ambiente rico em nutrientes para seu crescimento. A polpa de café fornece tais condições devido a uma constituição rica em leucina, valina, fenilalanina, treonina e isoleucina (Pereira et al. 2019). O catabolismo de aminoácidos tem implicações na formação de compostos de baixo peso molecular, tais como aldeídos, ésteres, ácidos carboxílicos e álcoois superiores (Figura 2). Por exemplo, cepas de *Lactobacillus plantarum* são capazes de produzir fenilacetaldeído, fenilacetato e feniletanol durante o catabolismo da fenilalanina, enquanto as cepas de *Lactococcus lactis* são capazes de metabolizar a leucina em 3-metilbutanal, 3-metilbutanol e ácido 3-metilbutírico acid (Smit et al. 2005; Vermeulen et al. 2006).

Figura 2: Representação esquemática das principais vias metabólicas e metabólitos gerados por BAL durante a fermentação do café.



2.5 IMPACTO NA EFICIÊNCIA DO PROCESSO E QUALIDADE DA BEBIDA

O metabolismo da BAL auxilia principalmente no processo de remoção da camada de mucilagem pelo uso eficiente de açúcares da polpa e formação de ácido láctico. O processo de acidificação da polpa também altera as propriedades de intumescimento da camada de mucilagem interna, soltando a rede de polissacarídeos com uma clara mudança estrutural (Pereira et al. 2017). Não é surpreendente que, empiricamente, os produtores de café usem a redução do pH para níveis abaixo de 4,5 como um método para determinar o fim do processo de fermentação (Jackels; Jackels 2005). Finalmente, as BALs são capazes de prevenir o crescimento de fungos associados à baixa qualidade da bebida (modificações negativas de sabor) e a produção de micotoxinas potencialmente prejudiciais aos consumidores (Pereira et al., 2016).

O complexo metabolismo da BAL produz metabólitos aromas que impactam na qualidade final do café. A intensa difusão de ácido láctico durante o processo de fermentação promove a modificação da percepção sensorial da acidez e do corpo de bebidas de café (Carvalho Neto et al., 2018; Pereira et al., 2016). Do metabolismo do citrato, a produção de 2,3-butanodiona e acetoina confere aroma amanteigado à bebidas (Pereira et al. 2019; Wang et al. 2019). Além disso, uma vasta gama de metabólitos derivados de BAL associados ao catabolismo de aminoácidos, especificamente propionato de etila, acetato de etila, acetaldeído, fenil etanol e fenilacetaldeído, são conhecidos por aumentar a percepção floral e de frutas na bebida final (Pereira et al. 2019).

Várias estirpes BAL foram desenvolvidas com aplicações na indústria alimentar. No entanto, as culturas iniciais de BAL comercialmente disponíveis atualmente não são projetadas diretamente para a fermentação de grãos de café, principalmente devido às peculiaridades físicas e químicas deste processo (Pereira et al. 2015). Uma estratégia primária para pesquisa em aplicações de alimentos é a triagem do ecossistema natural. Recentemente, a remoção da mucilagem de café utilizando fermentação láctica foi proposta pela introdução de uma bactéria do ácido láctico, *Lactobacillus plantarum* LPBR01, isolada da fermentação natural de café (Pereira et al., 2016). Esta bactéria foi capaz de promover um processo acelerado de acidificação da polpa de café, reduzindo o tempo necessário para a remoção da mucilagem em campo. Outra cultura, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, selecionada por Wang et al., (2019), também foi capaz de promover um consumo eficiente da polpa do café.

Sem dúvida, o aroma é uma das características mais importantes que contribuem para a qualidade do café. Como em muitos alimentos, o aroma do café é composto por mais de 1000 compostos orgânicos voláteis diferentes com concentrações que podem variar entre 845

e 1239 ppm (Cheong et al. 2013). O equilíbrio e interação de todos eles determinam a qualidade aromática do café. O uso de culturas BAL mostrou-se favorável para a produção de café com perfis sensoriais distintos. Bebidas de café com alta acidez e percepção de fruta e floral foram produzidas pelo uso do *L. plantarum* LPBR01 (Pereira et al., 2016), enquanto as características carameladas foram os atributos sensoriais para o tratamento inoculado com *L. rhamnosus* HN001. Essas bebidas de café podem ser usadas estrategicamente para suprir específicos consumidores de café ou serem usadas em misturas para alcançar a acidez desejável e o sabor característico.

Tabela 1. Principais metabólitos produzidos pelas BALs relacionada ao café, sua via metabólica e influências sensoriais.

Metabolite	Sensorial description	Metabolic pathway	Producing LAB	References
Lactic acid	Sour, acid	Embden-Meyerhoff-Parnas, phosphoketolase or pentose phosphate pathways	All species	(Endo and Dicks, 2014)
Benzaldehyde	Fruity, cherry	Tryptophan and phenylalanine catabolism	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> ,	(Hernandez-Orte et al., 2009; Nierop Groot MN and de Bont JAM, 1998; van Kranenburg et al., 2002) (Ott et al., 2000)
Acetaldehyde	Fruity	Threonine catabolism	<i>L. brevis</i> , <i>L. casei delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> and <i>Streptococcus thermophilus</i>	
3-methyl-butanol	Chocolate, nutty, leafy, cocoa	Branched-chain amino acids catabolism	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. helveticus</i>	(Klein et al., 2001; Kranenburg et al., 2002)
2-Nonenal	Fatty with a citrus nuance	Lipid oxidation	<i>L. sanfranciscensis</i> and <i>L. reuteri</i>	(Vermeulen et al., 2007)
Nonanal	Citrus, with a fresh green lemon peel-like nuance	β -oxidation of unsaturated free fatty acids	<i>L. sanfrancisco</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremosis</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	(Ayad et al., 1999; Gobetti and Corsetti, 1997; Sgarbi et al., 2013) (Ayad et al., 1999)
Decanal	Orange peel, citrus, and floral	β -oxidation of unsaturated free fatty acids	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremosis</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	
Ethyl acetate	Fruity, grape	Esterification reaction between alcohols and free fatty acids	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	(Liu et al., 2003; Gilberto Vinicius Melo Pereira et al., 2016)
Ethyl butanoate	-	Esterification reaction between alcohols and free fatty acids	<i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. casei</i> <i>Pediococcus</i> sp., <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremosis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremosis</i> , <i>Leu. lactis</i>	(Liu et al., 1998; Gilberto Vinicius Melo Pereira et al., 2016)
Ethyl propionate	Winey, grape and fermented with an eggnog nuance	Esterification reaction between alcohols and free fatty acids	<i>L. plantarum</i>	(Gilberto Vinicius Melo Pereira et al., 2016)
Ethyl hexanoate	Fruity, pineapple, banana	Esterification reaction between alcohols and free fatty acids	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	(Fenster et al., 2003; Liu et al., 2003; Gilberto Vinicius Melo Pereira et al., 2016)
3-methyl-1-butanol	Fruity, banana and molasses	Branched-chain amino acids catabolism	<i>Lc. Lactis</i> , <i>L. sanfrancisco</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	(Gadaga et al., 2001; Gobetti and Corsetti,

2-methyl-propanol	Winey	Valine catabolism	<i>L. helveticus</i>	1997; Kranenburg et al., 2002) (Klein et al., 2001)
Phenyl ethanol	Floral, rose, bready	Phenylalanine catabolism	<i>Stre. termophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i>	(Liu et al., 2003; Wang et al., 2019)
2-methyl-butanol	Roasted, winey, fruity	Isoleucine catabolism	<i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Stre. Termophilus</i>	(Gadaga et al., 2001; Muyanja et al., 2003)
1-Hexanol	Green, fruity, apple-skin and oily	3-keto-hexanoyl-CoA conversion	<i>L. plantarum</i>	(Dão P. Carvalho Neto et al., 2018; Coda et al., 2011)
2,3-Butanediol	Fruity, creamy, buttery	Citrate or aspartate assimilation	<i>L. plantarum</i>	(Dão P. Carvalho Neto et al., 2018; Paul, 2013)
Phenylacetaldehyde	Honey, floral, rose	Phenylalanine catabolism	<i>O. oeni</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lc. Lactis</i>	(Dão P. Carvalho Neto et al., 2018; Hernandez-Orte et al., 2009)
2-Phenethyl acetate	Floral with a slight yeasty, honey note	Phenylalanine catabolism	<i>L. plantarum</i>	(Dão P. Carvalho Neto et al., 2018)
Diacetyl	Creamy, buttery	Citrate or aspartate assimilation	<i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i>	(Wang et al., 2019)
Acetoin	Dairy, milky	Citrate or aspartate assimilation	<i>L. rhamnosus</i>	(Wang et al., 2019)

2.6 GENÔMICA FUNCIONAL

O recente desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento de alto rendimento expandiu nosso conhecimento sobre o potencial metabólico e os recursos de bioprocessamento das BALs. O genoma das BALs está entre os mais bem caracterizados até hoje. No entanto, apenas recentemente o sequenciamento completo do genoma de uma BAL (*Pediococcus acidilactici* LPBC101) originado da fermentação do café foi publicado (Muynarsk et al. 2019). Esse arranjo genômico forneceu dados sobre os mecanismos de adaptação e metabolismo de BAL no ambiente de processamento de café. *P. acidilactici* LPBC101 abriga um elevado número de genes únicos envolvidos na utilização de açúcares da polpa de café e codificando proteínas relacionadas com o stress (por exemplo, peroxidase de tiol, redutases de glutathione, NADH-oxidases e proteínas de choque alcalino). Além disso, esta linhagem de BAL possui uma notável diversidade fenotípica, possuindo todas as enzimas necessárias para as vias da glicólise e da pentose-fosfato (Muynarsk et al. 2019). A presença destes genes pode ser usada como evidência científica sólida na pesquisa de BAL com aplicações potenciais para processamento de café. No entanto, a informação do genoma fornece apenas um modelo preditivo, porque a expressão gênica é dependente das condições ambientais. Assim, os dados genômicos devem ser confirmados pelo transcriptoma, proteoma e perfilamento do metaboloma e aplicações em condições de campo. Essas plataformas devem ser incluídas nos estudos de seleção de BAL para obter uma compreensão profunda da função e dos efeitos da variedade selecionada no processamento do café

2.7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Até a presente data, a indústria do café gastou seus esforços aos compostos aromáticos formados durante o processo de torrefação e ignorou a possibilidade de controlar a fermentação do café durante o processamento na fazenda. Culturas de BALs têm grande potencial para alcançar controle, reprodutibilidade e consistência de qualidade durante o processamento de café. Em particular, o metabolismo de carboidratos, citrato e aminoácidos, e os principais componentes produzidos durante o seu crescimento, são as principais atividades associadas ao processamento do café. As BALs atuam desmucilando os frutos do café por meio da acidificação da polpa, além de formar metabólitos aromáticos que agregam qualidade aos produtos finais do café. No entanto, o uso de BAL no processamento de café tem sido largamente ignorado. Até o momento, apenas duas espécies, *Lactobacillus plantarum* LPBR01 e *L. rhamnosus* HN001, foram avaliadas em condições de campo. Esta é

uma pequena fração dentro da rica diversidade de espécies envolvidas em fermentações naturais. Por exemplo, o *Leuconostoc*, um grupo microbiano versátil com propriedades úteis, nunca foi selecionado como uma cultura iniciadora. Sem dúvida, todo o potencial das BALs relacionado ao café não foi totalmente determinado e muitos desafios aguardam pesquisa, disseminação e exploração industrial. Pesquisas futuras devem ser focadas na investigação de novas BALs e na possibilidade de criar culturas mistas multiuso com cepas de levedura. Conforme relatado acima, várias características influenciam as atividades da BAL na fermentação do café. Para obter uma imagem mais completa sobre a interação BAL na fermentação inoculada (pura e misturada com levedura), uma abordagem multifatorial usando metodologias “ômicas” deve ser planejada.

3 CAPÍTULO 2: EFEITO DA CO-INOCULAÇÃO COM *Pichia fermentans* E *Pediococcus acidilactici* NOS METABOLITOS PRODUZIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO E COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO GRÃO DE CAFÉ

Esse capítulo foi publicado como um artigo científico em 2019 e foi intitulado de “Effect of Co-Inoculation with *Pichia fermentans* and *Pediococcus acidilactici* on Metabolite Produced During Fermentation and Volatile Composition of Coffee Beans” na revista Fermentation. doi:10.3390/fermentation5030067

3.1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por café de alta qualidade tem sido ditada pelo aumento das taxas de consumo dos mercados cafeeiros tradicionais, como os Estados Unidos, União Europeia e a Ásia (Wilson e Wilson, 2014). Um contribuinte crítico para a bebida de café é uma série de práticas pós-colheita para obter grãos adequados para a torrefação (Huch e Franz, 2015). A colheita dos frutos é o primeiro passo no processamento pós-colheita. O desenvolvimento heterogêneo de frutos de café leva à presença simultânea de diferentes estádios de maturação no mesmo cafeeiro, (i) verde (imaturo), apresentando desenvolvimento incompleto do endosperma e reduzindo conteúdo de açúcares na camada mucilaginosa; (ii) cereja (maduro), apresentando mucilagem rica em açúcares redutores, desenvolvimento completo do endosperma e cor do exocarpo vermelho ou amarelo; e (iii) passa (overripe), que mostra as características iniciais do ciclo de nutrientes acumulado nos grãos (Da Matta et al., 2007). No Brasil, o maior produtor de café do mundo, estima-se que 31% dos frutos de café sejam colhidos em estágios imaturos (Mesquita et al., 2016). A presença desses grãos compromete a qualidade dos produtos de café por apresentar uma alta concentração de cafeína, trigonelinas e menor teor de açúcar devido ao ciclo incompleto de maturação (Franca et al., 2005; Oliveira et al., 2006).

Após a colheita, o processamento do café deve começar o mais rápido possível para evitar a deterioração da fruta por fermentação desfavorável ou formação de mofo. As camadas exteriores do fruto de café (isto é, a pele e a polpa) são facilmente removidas, enquanto a mucilagem, o pergaminho e a pele prateada estão firmemente ligadas aos grãos. A maneira como os produtores de café usam para remover a camada de mucilagem ligada aos frutos classifica o café no mercado internacional: “café natural”, produzido a partir de grãos de café processados na fazenda pelo método simples de secagem ao sol, conhecido como processamento a seco; e ‘café lavado’, produzido a partir de grãos de café que passam por

uma série relativamente complexa de etapas, incluindo despulpamento, fermentação e secagem ao sol, conhecido como processamento via úmido (Pereira et al., 2017).

No processamento via úmido, os grãos de café são submetidos à fermentação em tanques submersos para decomposição e remoção de mucilagem. Os açúcares presentes na mucilagem permitirão o crescimento de microrganismos, especialmente leveduras e bactérias do ácido láctico (por exemplo, *Pichia guilliermondii*, *P. anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis*) (Pereira et al., 2019). Estudos recentes têm sido dedicados ao uso de leveduras e bactérias do ácido láctico (BAL) como culturas iniciadoras puras no processamento pós-colheita a fim de reduzir o tempo necessário para a fermentação pelo aumento da produção de ácido láctico e modular o perfil sensorial dos grãos de café (Silva et al., 2013; Pereira et al., 2016; Wang et al., 2019). Entre os microrganismos selecionados, destaca-se a levedura *Pichia fermentans* YC5.2 e a BAL *Pediococcus acidilactici* LPBC161, que são culturas com características de consumo eficiente de açúcares da polpa do café e adaptabilidade aos fatores de estresse da fermentação de café (Muynarsk et al., 2019). Apesar do uso de culturas puras oferecer vantagens, estudos recentes em fermentações de vinho, carne e laticínios demonstram que as culturas mistas são capazes de melhorar as propriedades sensoriais e de segurança do produto final (Englezos et al., 2016; Xia et al., 2018).

Portanto o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de interação entre a inoculação mista de *Pichia fermentans* YC5.2 e *Pediococcus acidilactici* LPBC161 e a modulação química de grãos de café maduros e imaturos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTOS EM CAMPO

Os experimentos em campo foram realizados na Fazenda Baobá (21°42'42.8 " S, 46°49'42.2 " W; 1.400 m acima do nível do mar) situados em São Sebastião da Grama, estado de São Paulo, Brasil. Frutos de café maduros e imaturos (10 kg) foram depositados em baldes plásticos de 20 L com 5 L de água. Quatro conjuntos de protocolos de inoculação foram realizados em triplicata: (i) controle espontâneo (não-inoculado), (ii) fermentação de cultura pura com *Pichia fermentans* YC5.2, (iii) fermentação de cultura pura com *Pediococcus acidilactici* LPBC161, e (iv) inoculação simultânea de *Pichia fermentans* YC5.2 e *Pediococcus acidilactici* LPBC161. Antes da inoculação, as células de levedura e BAL foram contadas por uma câmara de hemocitómetro de Thoma utilizando corante azul de metileno como marcador de viabilidade celular. Em seguida, foram utilizadas quantidades apropriadas

de inóculo para atingir uma população celular inicial de cerca de 7 log CFU/mL. No final da fermentação, os grãos de café foram secos ao sol até que o valor de 12% de umidade fosse atingido.

4.2 AMOSTRAGEM E MEDIÇÃO DE PH

Amostras (50 mL) da fração líquida da polpa de café fermentada foram coletadas em triplicata em intervalos de 12 h para monitorar o consumo de açúcares e a produção de ácidos orgânicos, etanol e compostos voláteis. Em cada ponto de amostragem, o pH foi medido por meio de um medidor digital de pH (Requipal, Curitiba, Brasil).

4.3 ANÁLISE POR HPLC DA FERMENTAÇÃO DA POLPA DE CAFÉ

A concentração de açúcares redutores (glicose e frutose), ácidos orgânicos (ácidos cítrico, succínico, láctico, acético e propiônico) e etanol em polpa de café (fração líquida) foi determinada em intervalos de 12 h. Alíquotas de 2 mL foram centrifugadas a 6000 g durante 15 min e filtradas através de um filtro de 0,22 µm (Millipore Corp., Billerica, MA, EUA). Parâmetros de análise foram realizados segundo Carvalho Neto et al. (2017). As amostras filtradas foram injetadas no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) equipado com uma coluna Aminex HPX 87 H (300 x 7,8 mm; Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) e um detector de índice de refração (RI) (HPG1362A; Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, EUA). A coluna foi eluída em modo isocrático com uma fase móvel de 5 mM de H₂SO₄ a 60 °C e vazão de 0,6 mL/min.

4.4 ANÁLISE POR GC DA POLPA DE CAFÉ EM FERMENTAÇÃO

A formação dos principais compostos voláteis foi determinada em intervalos de 12 h por cromatografia gasosa. Para a preparação da amostra, alíquotas (4 mL) da fração líquida da polpa de café fermentada foram colocadas em 20 mL de frascos hermeticamente fechados contendo NaCl a 5% (p/v), seguido de aquecimento durante 10 min a 60°C. O headspace foi então coletado usando uma seringa de vidro (Hamilton, Bonaduz, Suíça) e injetado em um cromatógrafo a gás (modelo 17A; Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de ionização de chama a 230°C. As condições operacionais foram as seguintes: coluna capilar HP-5 de 30 mx 0,32 mm, temperatura da coluna de 40 a 150°C a uma taxa de 20°C /min (Pereira et al., 2016). Uma curva padrão foi construída usando padrões analíticos autênticos adquiridos da Sigma e a concentração dos compostos foi expressa em µmol/L de headspace

4.5 ANÁLISE GC/MS DE GRÃOS DE CAFÉ FERMENTADOS

A composição volátil dos grãos de café foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa (CG-MS) segundo Carvalho Neto, Pereira, Tanobe, et al. (2017). A extração de compostos voláteis das amostras dos grãos (2 g) foi realizada utilizando um frasco de *headspace* acoplado a uma fibra de microextração em fase sólida (SPME) de fibra DVB / CAR / PDMS (Supelco Co., Bellefonte, PA). Os frascos foram aquecidos a 70°C por 10 min sem agitação, seguidos de 15 min de exposição da fibra em sistema COMBI-PAL. Os compostos foram adsorvidos para a fase gasosa do sistema de injeção do cromatógrafo a gás (CGMS-gun TQ Series 8040 e 2010 Plus GC-MS; Shimadzu, Tóquio, Japão) a 260°C. A temperatura do forno da coluna foi mantida a 60 °C durante 10 min, seguida por duas rampas de aquecimento de 4 e 10 °C /min até atingir as temperaturas de 100 e 200°C, respectivamente. Os compostos foram separados numa coluna a 95% de PDMS / 5% de fenil (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm de espessura de filme). O GC foi equipado com um detector seletivo de massa HP 5972 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EUA). O hélio foi usado como gás carreador a uma taxa de 1,0 mL/min. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de electrões a 70 eV e uma razão de massa para carga de início e fim (m/z) de 30 e 200, respectivamente. Os compostos foram identificados por comparação com os espectros de massa das bases de dados das bibliotecas (Nist'98 e Wiley7N).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos da análise dos metabolitos foram analisados por comparação post-hoc de médias pelo teste de Duncan e uma análise de componentes principais (PCA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System Cary, NC, USA). O nível de significância foi estabelecido em um valor p de dois lados <0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

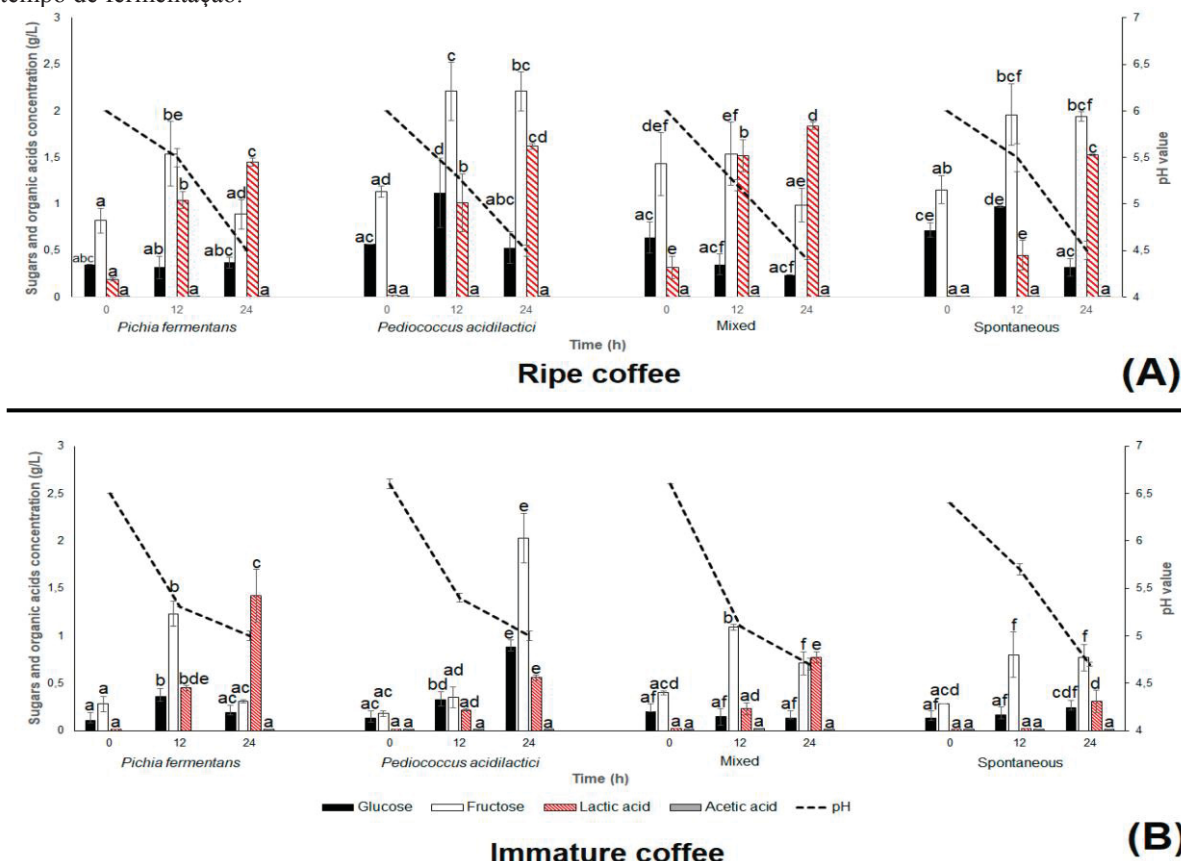
5.1 EXPERIMENTOS EM CAPO

O uso de fermentação mista em vez de cultura única é uma prática amplamente aplicada na produção de vinho, a fim de melhorar a complexidade aromática e a qualidade sensorial (Gobbi et al., 2013; Cinai et al., 2010). A fermentação mista oferece uma série de vantagens sobre fermentações convencionais de cultura única, incluindo maior taxa de crescimento microbiano, rendimento de metabólitos, melhor utilização do substrato e formação complexa de compostos aromáticos (Gaden et al., 1992). Este trabalho representa o primeiro estudo sobre uma cultura mista no processo de fermentação de grãos de café. Testamos

experimentalmente o impacto da combinação de duas culturas selecionadas (*P. fermentans* YC5.2 e *P. acidilactici* LPBC161) em termos de eficiência de fermentação e composição volátil do grãos de café. Os experimentos foram realizados com inoculações individuais e combinadas em grãos de café maduros e imaturos, comparados a um processo espontâneo. As alterações nos principais metabolitos não voláteis (açúcares, ácidos orgânicos e etanol) e voláteis foram quantificadas no decorrer do tempo de fermentação. A concentração inicial de açúcar na polpa dos frutos maduros de café (0,57 e 1,13 g/L de glicose e frutose, respectivamente) foi significativamente maior que a polpa imatura (0,13 e 0,26 g / L de glicose e frutose, respectivamente; Figura 1). Os baixos teores de açúcares no caso do café imaturo são consequência do ciclo de maturação incompletos (Eira et al., 2006). Em todos os processos de fermentação, a concentração de açúcar apresentou um aumento durante as 12 h iniciais. Este fenômeno pode ser associada com a hidrólise de pectina, celulose, sacarose, e outros carboidratos complexos de polpa de café, em monômeros de glicose e frutose (Marques et al., 2016; Murthy et al., 2011).

Após esse aumento, tanto a glicose quanto a frutose foram parcialmente consumidas, resultando em uma concentração residual de cerca de 0,37 e 1,51 g/L (polpa de café maduro) e 0,19 e 0,74 g/L (polpa de café imaturo) de glicose e frutose, respectivamente. Açúcares residuais da polpa de café são geralmente observados após o processo de fermentação, principalmente associado ao curto ciclo de fermentação (Pereira et al., 2015; Evangelista et al., 2014). No entanto, o consumo de frutose foi mais eficiente nos tratamentos que a levedura foi utilizada (*P. fermentans* - cultura pura e tratamento combinado com *P. fermentans* e *P. acidilactici*) do que a cultura pura de *P. acidilactici* e processo espontâneo (Figura 1). A capacidade da levedura em suportar fatores de tolerância ao estresse e a produção de enzimas pectinolíticas conferem vantagens em comparação com as bactérias do ácido láctico (Avallone et al., 2002; Pereira et al., 2014). Além disso, a baixa disponibilidade de nutrientes inicialmente disponíveis em polpa de café imaturo (Eira et al., 2006) pode ter restringido o desenvolvimento da *P. acidilactici*, mostrando baixo consumo de açúcar (Figura 1 B). As bactérias do ácido láctico são ainda distinguidas pelas suas capacidades biossintéticas limitadas, sendo incapazes de sintetizar múltiplos cofatores, vitaminas, purinas, pirimidinas e outros nutrientes (Muñoz et al., 2011).

Figura 1. Consumo da polpa, produção de ácidos orgânicos e monitoramento do pH (cultura pura com *Pichia fermentans*, cultura pura com *Pediococcus acidilactici* e fermentação combinada com *P. fermentans* e *P. acidilactici* e fermentação espontânea) de frutos maduros (A) e imaturo (B). A significância dos resultados foi avaliada usando uma ANOVA com teste post-hoc de Duncan a $p < 0,05$. Diferentes letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) indicam diferenças significativas dentro do mesmo processo (grãos de café maduros e imaturos) ao longo do tempo de fermentação.



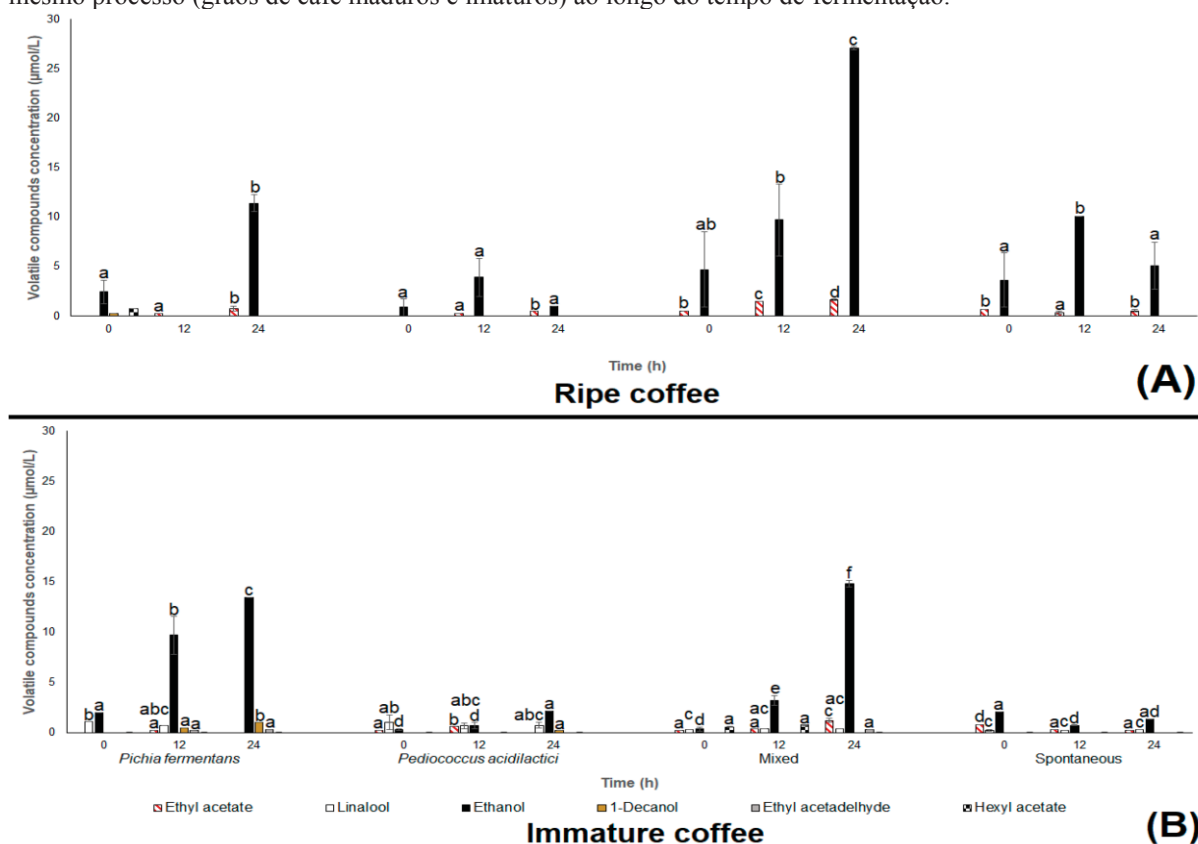
O ácido láctico mostrou um aumento significativo através dos processos fermentativos, atingindo concentrações máximas de $\geq 1,45$ e $\geq 0,53$ g/L nas fermentações do café maduros e imaturos, respectivamente (Figura 1). Concentrações basais de ácido acético ($\leq 0,01$ g / L) foram detectadas em todos os processos, o que pode estar associado ao metabolismo das leveduras ou à natureza heterofermentativa da *P. acidilactici* (Rantsiou et al., 1994; Endo et al., 2014). Ácidos de originados de fermentação excessiva, como os ácidos propiônico e butírico, não foram detectados em tratamentos com grãos de café maduros e imaturos. Nesse sentido, a acidificação da polpa de café fermentada pode ser atribuída principalmente ao teor de ácido láctico. Como esperado, a medida que a concentração de ácido láctico aumentou, o pH diminuiu progressivamente durante todos os processos de fermentação (Figura 1). O ácido láctico é um importante metabólito associado à fermentação do café, que auxilia no processo de acidificação da polpa sem interferência no produto final (Figura 1). O monitoramento do pH é um parâmetro crucial, pois valores de pH abaixo de 4,5 são utilizados para indicar o fim do processo de fermentação do café (Carvalho Neto et al., 2018;

Velmourougane et al., 2013; Jackels et al., 2005). Nos tratamentos imaturos de café, foi relatado um pH superior a 4,5, o que pode ser atribuído ao desenvolvimento insuficiente da *P. acidilactici*.

Etanol e acetato de etila foram os principais compostos voláteis detectados durante os processos de fermentação (Figura 2). Curiosamente, inoculações combinadas com *P. acidilactici* e *P. fermentans* resultaram em um aumento significativo na produção desses metabólitos quando comparado a culturas puras e ao processo espontâneo. Os maiores valores de etanol (27,04 e 14,8 $\mu\text{mol/L}$) e acetato de etila (1,63 e 1,21 $\mu\text{mol/L}$) foram alcançados após 24 h de fermentações mista com grão de café maduros e imaturos, respectivamente. Isso corrobora com os dados de Sun et al., 2013 e Cañas et al., 2015 que demonstraram um aumento de ésteres e acetato de etila como resultado da co-inoculação de BAL e leveduras na fermentação de vinho. O consumo significativo de açúcar e ácido láctico, acetato de etila e produção de etanol em tratamentos com inoculações combinadas indicaram uma interação ecológica entre esses dois grupos microbianos. A natureza complexa dessa interação é destacada pelas observações de que (i) a autólise de leveduras libera nutrientes, como aminoácidos, polissacarídeos e riboflavina favoráveis ao crescimento bacteriano, e que (ii) a acidificação dos meios de fermentação pela BAL cria um ambiente propício para o desenvolvimento de leveduras (Pereira et al., 2017; Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006; Fleet, 2003). Essas interações positivas mostraram promover os atributos sensoriais desejados no vinho, no sourdough e no iogurte. No entanto, informações sobre esses mecanismos na fermentação do café são escassas (Junqueira et al., 2019).

Outros compostos voláteis menores que aumentaram durante os processos de fermentação foram 1-decanol, etilacetaldeído e acetato de hexila (Figura 2). As BAL e levedura produzem acetaldeído de etila por uma reação de condensação entre ácidos graxos e uma molécula de álcool (Saerens et al., 2010), enquanto o 1-decanol pode ser derivado do catabolismo de aminoácidos pela via de Ehrlich (Pereira et al., 2014; Elías, 1979). A presença e concentrações mais elevadas de linalool nos frutos imaturos pode estar associada ao estágio de maturação inferior dos grãos de café, uma vez que esse composto tem sido considerado um marcador volátil de bebidas de café produzidas a partir de frutos imaturos (Toci et al., 2014).

Figura 2. Concentração de compostos voláteis (cultura pura com *P. fermentans*, cultura pura com *P. acidilactici* e fermentação combinada com *P. fermentans* e *P. acidilactici*) e fermentação espontânea de grão de café maduros (A) e imaturos (B). A significância dos resultados foi avaliada usando uma ANOVA com teste post-hoc de Duncan a $p < 0,05$. Diferentes letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) indicam diferenças significativas dentro do mesmo processo (grãos de café maduros e imaturos) ao longo do tempo de fermentação.



5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE GRÃOS DE CAFÉ

Mais de 900 compostos voláteis já foram identificados em grãos de café verde e torrado (Evangelista, Miguel, et al., 2014; Oestreich-Janzen, 2013). Entre os principais voláteis encontrados, pirazinas, furanos, cetonas, aldeídos, álcoois superiores, ésteres e compostos de enxofre podem ser destacados (Akiyama et al., 2008; Gonzalez-Rios et al., 2007; Toledo et al., 2008). Embora alguns destes compostos aromatizantes se originem do próprio grão, estudos recentes revelaram que os metabólitos derivados de microrganismos também podem se difundir para os grãos de café (Carvalho Neto et al., 2018; Evangelista, Miguel, et al., 2014; Lee et al., 2016; Pereira et al., 2015; Wang et al., 2019). Após a caracterização da composição volátil dos grãos de café fermentados, observou-se que a inoculação de *P. fermentans* e *P. acidilactici*, tanto em tratamentos puros quanto combinados, resultou na modulação da constituição volátil dos grãos de café. Um total de 30 compostos foram identificados em grãos de café maduros, incluindo álcoois superiores (sete compostos), aldeídos (seis compostos) e terpenos (três compostos) (Tabela 1). Entre estes, 1-hexanol, 2-heptanol, álcool feniletílico e benzeneacetaldéido foram os principais voláteis encontrados. A

inoculação única de *P. fermentans* e *P. acidilactici* resultou na formação e difusão de alguns compostos voláteis, como 3 octanol, 2-heptenal, benzaldeído, dodecanal e D-limoneno, que não foram detectados no processo espontâneo. Estes compostos estão estritamente relacionados ao metabolismo das leveduras e das BAL, tais como aldeídos e álcoois superiores formados a partir do catabolismo dos aminoácidos da polpa de café e terpenos através da via do ácido mevalônico ou liberados dos precursores glicosídicos durante a fermentação (Mendes-Ferreira, Barbosa, Falco, Leão, & Mendes-Faia, 2009; Pereira et al., 2019; Yvon & Rijnen, 2001).

Grãos de café gerados a partir de tratamentos combinados mostraram um aumento significativo ($p < 0,05$) de compostos voláteis específicos, como benzeneacetaldeído, 2-heptanol e álcool benzílico. Esses achados estão de acordo com Englezos et al., (2016) e Plessas et al., (2008) que demonstraram que tratamentos mistos com leveduras e BAL permitem maior produção de ésteres, aldeídos e álcoois superiores em fermentações de vinho quando comparadas a inoculações únicas. No entanto, mais estudos são necessários para evidenciar as vias metabólicas associadas à interação positiva entre esses microrganismos em produtos de café.

A análise química dos grãos de café imaturos revelou uma composição com menor diversidade e concentração de compostos voláteis (Tabela 2). Um total de 19 compostos foram detectados, incluindo álcoois superiores (quatro compostos), ácidos orgânicos (três compostos) e aldeídos (três compostos). A inoculação única de *P. fermentans* resultou em grãos de café com concentrações significativamente maiores ($p < 0,05$) de 2-hexanol, nonanal e D-limoneno quando comparado ao processo espontâneo. Estes compostos são comumente atribuídos ao metabolismo da *Pichia* (Leclercq Perlat, Corrieu, & Spinnler, 2010; Patrignani et al., 2016; Pereira et al., 2019). Isso corrobora com os resultados do monitoramento do processo de fermentação, que demonstrou uma intensa atividade microbiana de *P. fermentans* em polpa imatura de café. Por outro lado, grãos de café derivados da cultura pura de *P. acidilactici* e do tratamento combinado não apresentaram aumento significativo ($p > 0,05$) nos constituintes voláteis quando comparados ao controle (processo espontâneo). Este fato pode ser correlacionado ao crescimento insuficiente da cultura BAL no ambiente escasso de nutrientes da polpa dos grãos de café imaturos. O auxotrofismo de vários aminoácidos torna a BAL diretamente dependente de um meio de crescimento rico para o seu pleno desenvolvimento (Endo e Dicks, 2014)

Para explicar as características químicas e o agrupamento das amostras, os parâmetros da Tabela 1 e da Tabela 2 foram analisados por um PCA (Figura 3). Os primeiro e segundo

componentes principais explicaram, juntos, 73,66% da variabilidade total dos dados. As amostras foram categorizadas em dois grupos, isto é, grãos de café maduros e imaturos. Essa distinção foi principalmente relacionada à constituição mais rica de voláteis de grãos de café maduros em relação aos tratamentos imaturos. Além disso, a presença de compostos específicos (álcool benzílico, álcool feniletílico, benzeneacetaldeído, decanal e D-limoneno em grãos de café maduros e furan-2-pentil, ácido 2-metil-butanóico e pirazina, 2-metoxi-3-(2-metilpropil) em grãos de café imaturos) também contribuiu para a separação de grãos de café maduros e imaturos na análise de PCA. Curiosamente, apenas o tratamento com *P. fermentans* agrupou grãos de café imaturos no eixo positivo, o que corrobora com a melhor adaptação e geração de voláteis em polpa de café imatura.

Figura 3. Análise de componentes principais (PCA) de compostos voláteis (losangos) identificados nos diferentes tratamentos de grãos de café maduros (círculos abertos) e imaturos (círculos fechados). Abreviaturas: SR - controle espontâneo e maduro; Inoculação PiR-*Pichia* em grãos de café maduros; PeR - inoculação de *Pediococcus* em grãos de café maduros; MR - inoculação mista (*Pichia* mais *Pediococcus*) em grãos de café maduros; SI - controle espontâneo e imaturo; Inoculação PiI - *Pichia* em grãos de café imaturos; PeI - inoculação de *Pediococcus* em grãos de café imaturos; MI - inoculação mista (*Pichia* mais *Pediococcus*) em grãos de café imaturos. 1—butanoic acid, 3-methyl; 2—butanoic acid, 2-methyl; 3—hexanoic acid; 4—1-hexanol; 5—2-heptanol; 6—5-methyl-2-hexanol; 7—2-hexanol; 8—1-octen-3-ol; 9—3-octanol; 10—benzylalcohol; 11—phenylethyl alcohol; 12—butanoic acid, 2-methyl, ethyl ester; 13— butanoic acid, 2-methyl, ethyl ester; 14—methyl salicylate; 15—2-heptenal; 16—benzaldehyde; 17—dodecanal; 18—nonanal; 19—benzeneacetaldehyde; 20—decanal; 21—2-heptanone; 22—pyridine, 2,3-dimethyl; 23—pyridine, 2,6-lutidine; 24—butyrolactone; 25—linalool; 26—D-limonene; 27—anethole; 28—furan-2-pentyl; 29—styrene; 30—tetradecane; 31—2(3)-furanone, dihydro-5-methyl; 32—pyrazine, 2-methoxy-3-(2-methylpropyl); 33—hexadecane.

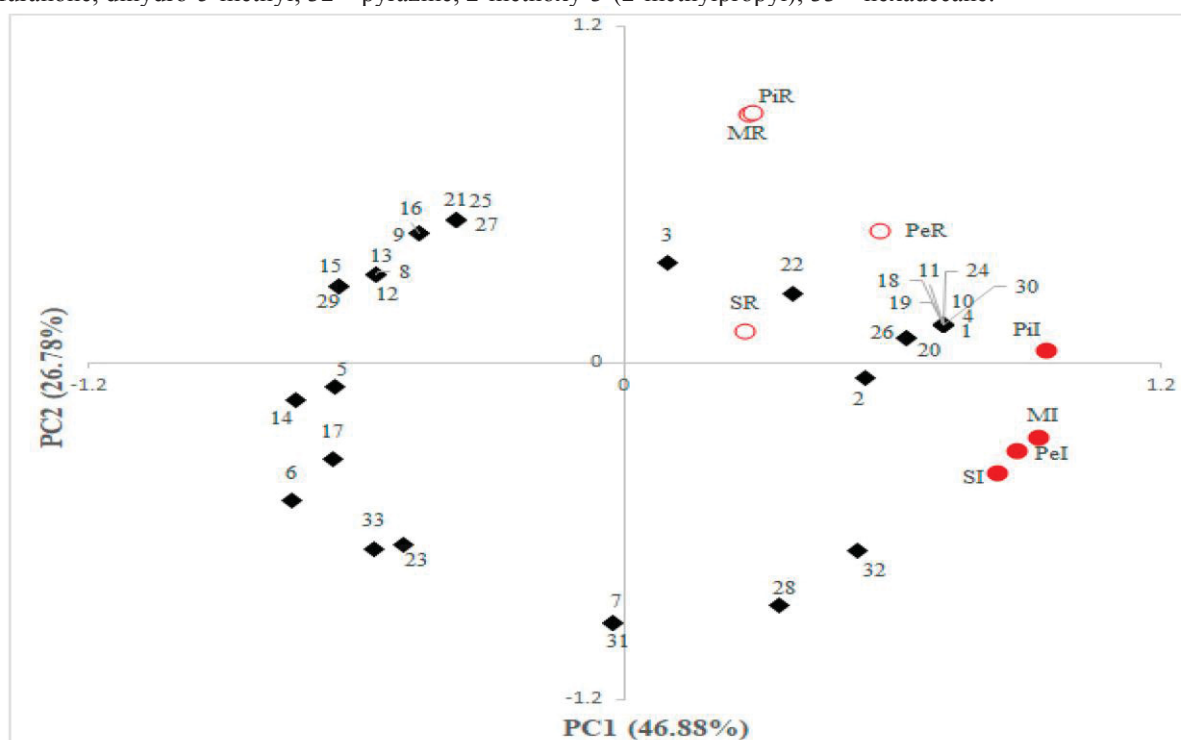


Tabela 1: Concentração de compostos voláteis (Área*10⁵) em grãos de café maduros após tratamento com culturas individuais, combinado e espontâneo. Meios de triplicata em cada linha com as mesmas letras minúsculas (a, b) não são significativamente diferentes (p> 0,05) um do outro usando o Teste de Duncan (média ± variação padrão).

Compounds	Aroma perception	Fermented ripe coffee beans			
		Spontaneous	<i>P. fermentans</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. fermentans</i> + <i>P. acidilactici</i>
<i>Organic acids</i> (3)					
Butanoic acid, 3-methyl	-	7.02 ± 1.00 ^a	6.88 ± 1.48 ^a	6.10 ± 1.74 ^a	6.91 ± 0.18 ^a
Butanoic acid, 2-methyl	Fruity, dirty, acidic with a dairy buttery	1.77 ± 0.35 ^a	1.98 ± 0.28 ^a	ND	1.79 ± 0.28 ^a
Hexanoic acid	Sour, fatty, sweat, cheesy	ND	1.34 ± 0.61 ^a	0.99 ± 0.23 ^a	1.67 ± 0.88 ^a
<i>Higher alcohols</i> (7)					
2-Heptanol	Fresh, lemon grass, herbal	10.21 ± 0.00 ^a	ND	ND	12.12 ± 0.10 ^b
5-Methyl-2-Hexanol	-	6.09 ± 2.66	ND	ND	ND
1-Hexanol	Green, fruity, apple-skin and oily	15.90± 2.36 ^a	16.95 ± 2.23 ^a	17.10 ± 2.36 ^a	18.24 ± 0.17 ^a
1-Octen-3-ol	Earthy, green, oily, umami sensation	0.82 ± 0.00 ^a	0.80 ± 0.17 ^a	ND	0.86 ± 0.03 ^a
3-Octanol	Musty, mushroom, earthy, creamy dairy	ND	0.50 ±0.14 ^a	0.58 ± 0.00 ^a	0.67 ± 0.00 ^a
Benzylalcohol	Sweet, fruity with balsamic nuances	2.58 ± 0.05 ^a	3.26 ± 0.36 ^a	3.20 ± 0.68 ^a	4.31 ± 0.17 ^b
Phenylethyl alcohol	Floral, sweet and bready	9.52 ± 0.73 ^a	10.34 ± 0.41 ^a	12.17 ± 0.25 ^b	12.60 ± 1.31 ^b
<i>Esters</i> (3)					
Butanoic acid, 2-methyl, ethyl ester	-	0.58 ± 0.26 ^a	0.34 ± 0.00 ^a	ND	0.54 ± 0.20 ^a
Butanoic acid, 3-methyl- ethyl ester	-	4.62 ± 0.59 ^a	3.66 ± 1.71 ^a	ND	4.70 ± 0.57 ^a
Methyl salicylate	Wintergreen, mint-like	ND	0.28 ± 0.01	ND	ND
<i>Aldehydes</i> (6)					
2-Heptenal	Sweet, fresh fruity apple skin nuances	ND	0.80 ± 0.00 ^a	ND	0.80 ± 0.00 ^a
Benzaldehyde	Fruity, cherry	ND	0.32 ± 0.00 ^a	2.15 ± 0.84 ^a	2.56 ± 0.69 ^a
Dodecanal	Soapy, waxy, citrus, orange mandarin	ND	ND	0.23 ± 0.14	ND
Nonanal	With a fresh green lemon peel-like nuance	0.95 ± 0.05 ^a	0.93 ± 0.35 ^a	0.81 ± 0.06 ^a	0.84 ± 0.27 ^a
Benzeneacetaldehyde	Almond, fruity, powdery, nutty	1.83 ± 0.29 ^a	2.80 ± 0.73 ^a	2.28 ± 0.04 ^a	6.94 ± 0.00 ^b
Decanal	Sweet, aldehydic, orange, waxy and citrus rind	ND	0.37 ± 0.11 ^a	0.37 ± 0.09 ^a	0.34 ± 0.07 ^a
<i>Ketone</i> (1)					
2-Heptanone	Fruity, spice, herbal	3.49 ± 0.69 ^a	2.92 ± 0.28 ^a	2.29 ± 0.90 ^a	4.38 ± 1.75 ^a
<i>Pyridine</i> (2)					
Pyridine, 2,3-dimethyl	-	ND	1.55 ± 0.94 ^a	1.44 ± 0.26 ^a	1.25 ± 0.63 ^a
Pyridine, 2,6-Lutidine	Nutty, amine, woody	1.85 ± 0.19	ND	ND	ND

<i>Lactone (1)</i>							
Butyrolactone							
<i>Terpenes (3)</i>							
Linalool							
D-Limonene							
Anethole							
<i>Hydrocarbons (2)</i>							
Styrene							
Tetradecane							
<i>Pyrazine (1)</i>							
Pyrazine, 2-methoxy-3-(2-methylpropyl)							
<i>Furan (1)</i>							
Furan, 2-pentyl							

Creamy, oily, fatty, caramellic	5.28 ± 0.10 ^a	6.17 ± 1.04 ^a	4.86 ± 1.13 ^a	6.09 ± 0.13 ^a
Citrus, orange, lemon	2.36 ± 0.29 ^a	2.27 ± 0.21 ^a	2.22 ± 0.82 ^a	2.92 ± 0.17 ^b
Sweet, orange, citrus	ND	1.29 ± 0.60 ^a	1.37 ± 0.49 ^a	1.42 ± 0.35 ^a
-	4.10 ± 1.00 ^b	1.87 ± 0.26 ^a	1.96 ± 0.66 ^a	3.13 ± 0.20 ^{a,b}
Sweet, balsamic, floral	ND	2.89 ± 0.00 ^a	ND	3.15 ± 0.00 ^a
Waxy	0.91 ± 0.07 ^a	0.82 ± 0.06 ^a	0.88 ± 0.16 ^a	0.80 ± 0.06 ^a
Roasted almond hazelnut peanut	0.92 ± 0.04 ^a	ND	0.93 ± 0.08 ^a	ND
Waxy, with musty, cooked caramellic nuances	1.16 ± 0.04	ND	ND	ND

Tabela 2: Concentração de compostos voláteis (Área * 10⁵) em grãos de café imaturos após tratamento com culturas individuais, combinado e espontâneo. Meios de triplicata em cada linha com as mesmas letras minúsculas (a, b, c) não são significativamente diferentes (p > 0,05) um do outro usando o Teste de Duncan (média ± variação padrão).

Compounds	Aroma perception	Fermented immature coffee beans			
		Spontaneous	<i>P. fermentans</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. fermentans</i> + <i>P. acidilactici</i>
<i>Organic acids</i> (3)					
Butanoic acid, 3-methyl	-	7.77 ± 1.05 ^a	5.99 ± 2.31 ^a	8.56 ± 1.57 ^{a, b}	5.15 ± 0.98 ^{a, c}
Butanoic acid, 2-methyl	Fruity, acidic with a dairy buttery	1.32 ± 0.36 ^a	1.24 ± 0.86 ^a	1.65 ± 0.13 ^{a, b}	0.69 ± 0.15 ^{a, c}
Hexanoic acid	Sour, fatty, sweat, cheesy	ND	0.63 ± 0.15 ^a	0.50 ± 0.11 ^a	ND
<i>Higher alcohols</i> (4)					
1-Hexanol	Green, fruity, apple-skin and oily	10.02 ± 0.26 ^a	10.57 ± 1.33 ^a	9.14 ± 1.51 ^a	9.85 ± 1.17 ^a
2-Hexanol	-	0.36 ± 0.05 ^a	0.75 ± 0.01 ^b	ND	0.45 ± 0.10 ^a
Benzylalcohol	Sweet, fruity with balsamic nuances	0.54 ± 0.15 ^a	0.62 ± 0.08 ^a	0.51 ± 0.20 ^a	0.61 ± 0.04 ^a
Phenylethyl alcohol	Floral, sweet and bready	2.54 ± 0.38 ^a	2.78 ± 0.17 ^b	2.24 ± 0.12 ^a	2.20 ± 0.18 ^a
<i>Aldehydes</i> (3)					
Nonanal	Citrus, with a fresh green lemon peel-like nuance	0.30 ± 0.08 ^a	0.74 ± 0.04 ^b	0.46 ± 0.07 ^{c, d}	0.48 ± 0.05 ^d
Benzeneacetaldehyde	Almond, fruity, powdery, nutty	0.21 ± 0.00 ^a	0.28 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.13 ^a	0.38 ± 0.00 ^a
Decanal	Sweet, orange, waxy and citrus rind	0.24 ± 0.09 ^a	0.43 ± 0.06 ^a	0.30 ± 0.10 ^a	0.42 ± 0.08 ^a
<i>Pyridines</i> (2)					
Pyridine, 2,3-dimethyl	-	ND	1.45 ± 0.34 ^a	0.62 ± 0.14 ^a	1.10 ± 0.36 ^a
Pyridine, 2,6-Lutidine	Nutty, woody, bready and vegetable-like	0.95 ± 0.35	ND	ND	ND
<i>Lactone</i> (1)					
Butyrolactone	Creamy, oily, fatty, caramellic	0.92 ±0.07 ^a	0.46 ± 0.20 ^a	0.66 ± 0.26 ^a	0.49 ± 0.17 ^a
<i>Terpenes</i> (1)					
D-Limonene	Sweet, orange, citrus	0.36 ± 0.06 ^a	0.72 ± 0.16 ^b	0.16 ± 0.09 ^c	0.41 ± 0.19 ^a
<i>Furans</i> (2)					
Furan-2-pentyl	Waxy, cooked caramellic nuances	0.57 ± 0.17 ^a	0.74 ± 0.12 ^a	0.58 ± 0.15 ^a	0.69 ± 0.13 ^a
2(3)-Furanone, dihydro-5-methyl	Waxy with a citrus fruity nuance	0.55 ± 0.14 ^a	0.38 ± 0.16 ^a	ND	0.45 ± 0.15 ^a
<i>Hydrocarbons</i> (2)					
Hexadecane	-	ND	0.55 ± 0.01	ND	ND
Tetradecane	Waxy	0.62 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.07 ^b	0.30 ± 0.06 ^c	0.76 ± 0.10 ^{a, c}

<i>Pyrazine (1)</i>				
Pyrazine, 2-methoxy-3-(2-methylpropyl)	Roasted almond	hazelnut	peanut	
			0.78 ± 0.07^a	0.80 ± 0.01^a
			0.85 ± 0.12^a	0.92 ± 0.08^a

6 CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo a investigar o impacto da co-inoculação com levedura e BAL na fermentação de frutos maduros e imaturos de café. Entre os diferentes tratamentos, inoculações combinadas com *Pichia fermentans* YC5.2 e *Pediococcus acidilactici* LPBC161 em frutos maduros de café mostraram características interessantes. Foi possível alcançar o aumento do consumo de açúcar na polpa de café e a produção de metabólitos (ácido láctico, etanol e acetato de etila), evidenciando uma interação sinérgica positiva entre esses dois grupos microbianos. Por outro lado, quando se utiliza frutos imaturos de café, apenas a *Pichia fermentans* foi capaz de melhorar a formação de metabólitos durante a fermentação e afetar a composição volátil dos grãos de café. Isso pode ser devido à alta exigência nutricional das espécies BAL e à baixa adaptabilidade em polpas de café imaturas. De qualquer forma, uma vez que os grãos de café imaturos geralmente têm uma qualidade baixa porque a formação de precursores com sabor é incompleta, o metabolismo da levedura tem um grande potencial para adicionar qualidade e sabor a esses grãos.

A análise química revelou uma composição volátil mais complexa dos grãos de café fermentados a partir do tratamento combinado em relação às inoculações puras e ao processo espontâneo. Os principais compostos afetados foram o benzeneacetaldeído, o 1-hexanol, o álcool benzílico, o 2-heptanol e o álcool feniletílico, que são relatados como importantes compostos com impacto no aroma. Assim, este estudo mostra o grande potencial da inoculação combinada para a formação de compostos aromáticos desejáveis e produção de cafés especiais. Novos estudos ainda são necessários para investigar os mecanismos de sinergismo entre leveduras e BAL e sua influencia nas propriedades sensoriais do café.

7 REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, M.; MURAKAMI, K.; HIRANO, Y.; et al. Characterization of headspace aroma compounds of freshly brewed arabica coffees and studies on a characteristic aroma compound of Ethiopian coffee. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, 2008.
- ALEXANDRE, H.; GUILLOUX-BENATIER, M. Yeast autolysis in sparkling wine - A review. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 12, n. 2, p. 119–127, 2006.
- AVALLONE, S.; BRILLOUET, J. M.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 191–198, 2002.
- AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J. M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 252–256, 2001.
- AVALLONE, S.; GUIRAUD, J. P.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; BRILLOUET, J. M. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1308–1311, 2000.
- CAÑAS, P. M. I.; ROMERO, E. G.; PÉREZ-MARTÍN, F.; SESEÑA, S.; PALOP, M. L. Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. **Food Science and Technology International**, v. 21, n. 3, p. 203–212, 2015.
- CARVALHO NETO, D. P.; MELO PEREIRA, G. V.; FINCO, A. M. O.; et al. Efficient coffee beans mucilage layer removal using lactic acid fermentation in a stirred-tank bioreactor: Kinetic, metabolic and sensorial studies. **Food Bioscience**, v. 26, p. 80–87, 2018. Elsevier Ltd.
- CAVANAGH, D.; FITZGERALD, G. F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food Microbiology**, v. 47, p. 45–61, 2015. Elsevier Ltd.
- CARVALHO NETO, D. P.; PEREIRA, G. V. DE M.; FINCO, A. M. O.; et al. Efficient coffee beans mucilage layer removal using lactic acid fermentation in a stirred-tank bioreactor: Kinetic, metabolic and sensorial studies. **Food Bioscience**, v. 26, p. 80–87, 2018.
- CARVALHO NETO, D. P.; PEREIRA, G. V. M.; TANOBE, V. O. A.; et al. Yeast Diversity and Physicochemical Characteristics Associated with Coffee Bean Fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro Region. **Fermentation**, v. 3, n. 1, p. 11, 2017.
- CHEONG, M. W.; TONG, K. H.; ONG, J. J. M.; et al. Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. **Food Research International**, v. 51, n. 1, 2013.
- CHEN, Y.-S.; YANAGIDA, F.; SHINOHARA, I. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 195–200, 2005.
- CIANI, M.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; DOMIZIO, P. Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 2, p. 123–133, 2010.

- DA MATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 485–510, 2007.
- DRIDER, D.; BEKAL, S.; PRÉVOST, H. Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 2, p. 273–281, 2004.
- DE BRUYN, F.; ZHANG, S. J.; POTHAKOS, V.; et al. Exploring the Impacts of Postharvest Processing on the Microbiota and Metabolite Profiles during Green Coffee Bean Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 1, p. e02398-16, 2017.
- EIRA, M.T.S.; DA SILVA, E.A.A.; DE CASTRO, R.D.; DUSSERT, S.; WALTERS, C.; BEWLEY, J.D.; HILHORST, W.M. Coffee seed physiology. **Braz. J. Plant Physiol.** 2006, 18, 149–163.
- EVANGELISTA, S. R.; MIGUEL, M. G. C. P.; CORDEIRO, C. S.; et al. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. **Food Microbiology**, v. 44, p. 87–95, 2014.
- EVANGELISTA, S. R.; SILVA, C. F.; MIGUEL, M. G. P. DA C.; et al. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. **Food Research International**, v. 61, p. 183–195, 2014. Elsevier Ltd.
- ENDO, A.; DICKS, L. M. T. Physiology of the LAB. In: W. H. Holzapfel; B. J. B. Wood (Orgs.); **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**. p.13–30, 2014. Chichester: Wiley Blackwell.
- ENDO, A.; SALMINEN, S. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 444–448, 2013.
- ENGLEZOS, V.; TORCHIO, F.; CRAVERO, F.; et al. Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 567–575, 2016. Elsevier Ltd.
- ELÍAS, L.G. Chemical composition of coffee-berry by-products. In *Coffee Pulp: Composition, Technology, and Utilization*; Braham, J.E., Bressani, R., Eds.; IDRC: Ottawa, ON, Canada, 1979; pp. 11–16.
- FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; MENDONÇA, J. C. F.; SILVA, X. A. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, v. 90, p. 89–94, 2005.
- FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1–2, p. 11–22, 2003.
- GARCÍA-QUINTÁNS, N.; REPIZO, G.; MARTÍN, M.; MAGNI, C.; LÓPEZ, P. Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 1988–1996, 2008.
- GADEN JR, E. L.; BOKANGA, M.; HARLANDER, S.; HESSELTINE, C. W.; STEINKRAUS, K. H. **Applications of biotechnology to traditional fermented foods**.

Washington: National Academy Press, 1992.

GONZALEZ-RIOS, O.; SUAREZ-QUIROZ, M. L.; BOULANGER, R.; et al. Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 289–296, 2007.

HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 467–494, 2004.

HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. B. Introduction to the LAB. In: W. H. Holzapfel; B. J. B. Wood (Orgs.); **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**. p.1–12, 2014. Boca Raton: Wiley Blackwell.

HUCH, M.; FRANZ, C. M. A. P. **Coffee: Fermentation and microbiota**. Woodhead Publishing, 2015.

HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 165–178, 1993

HUYS, G.; LEISNER, J.; BJÖRKROTH, J. The lesser LAB gods: Pediococcus, Leuconostoc, Weissella, Carnobacterium, and affiliated genera. In: S. Lahtinen; A. C. Ouwehand; S. Salminen; A. von Wright (Orgs.); **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and functional aspects**. 4th ed, p.93–121, 2012. Boca Raton: CRC Press.

JACKELS, S. C.; JACKELS, C. F. Characterization of the coffee mucilage fermentation process using chemical indicators: a field study in Nicaragua. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 70, n. 5, p. 321–325, 2005.

JUNQUEIRA, A.C.O.; PEREIRA, G.V.M.; MEDINA, J.D.C.; ALVEAR, M.C.R.; ROSERO, R.; CARVALHO NETO, D.P.; ENRÍQUEZ, H.G.; SOCCOL, C.R. First description of bacterial and fungal communities in Colombian coffee beans fermentation analysed using Illumina-based amplicon sequencing. *Sci. Rep.* 2019, 9, 8794.

JOUGHTEN, P.; PONOMAROVA, O.; GONZALEZ, R.; PATIL, K. R. Saccharomyces cerevisiae metabolism in ecological context. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 7, p. 1–8, 2016.

LEE, L. W.; CHEONG, M. W.; CURRAN, P.; YU, B.; LIU, S. Q. Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with Rhizopus oligosporus: I. Green coffee. **Food Chemistry**, v. 211, p. 916–924, 2016.

LEONG, K.-H.; CHEN, Y.-S.; PAN, S.-F.; et al. Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Fresh Coffee Cherries in Taiwan. **Current Microbiology**, v. 68, p. 440–447, 2014.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 67–78, 2004.

LECLERCQ-PERLAT, M.-N.; CORRIEU, G.; SPINNLER, H.-E. Comparison of Volatile Compounds Produced in Model Cheese Medium Deacidified by Debaryomyces hansenii or Kluyveromyces marxianus. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 5, p. 1545–1550, 2010. Elsevier

MARQUES, W. L.; RAGHAVENDRAN, V.; STAMBUK, B. U.; GOMBERT, A. K. Sucrose

and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. (J. Nielsen, Org.) **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. f0v107, 2016.

MAYO, B.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; FERNÁNDEZ, M.; et al. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: F. Mozzi; R. R. Raya; G. M. Vignolo (Orgs.); **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. p.3–32, 2010. Iowa: Wiley-Blackwell.

MURTHY, P. S.; MADHAVA NAIDU, M. Improvement of Robusta Coffee Fermentation with Microbial Enzymes. **European Journal of Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 130–139, 2011.

MUYNARSK, E. S. M.; PEREIRA, G. V. M.; MESA, D.; et al. Draft genome sequence of *Pediococcus acidilactici* strain LPBC161, isolated from mature coffee cherries during natural fermentation. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, p. e00332-19, 2019.

MUÑOZ, R.; MORENO-ARRIBAS, M.V.; DE LAS RIVAS, B. Lactic acid bacteria. In **Molecular Wine Microbiology**, 1st ed.; Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R., Eds.; Academic Press: Burlington, VT, USA, 2011; pp. 191–226.

MESQUITA, C. M. DE; REZENDE, J. E. DE; CARVALHO, J. S.; et al. **Manual do café: Colheita e preparo**. Belo Horizonte: Emater, 2016.

MENDES-FERREIRA, A.; BARBOSA, C.; FALCO, V.; LEÃO, C.; MENDES-FAIA, A. The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 571–583, 2009.

NARVHUS, J. A.; AXELSSON, L. Lactic acid bacteria. In: Benjamin Caballero (Org.); **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2nd ed, p.3465–3472, 2003. Boca Raton: CRC Press.

OESTREICH-JANZEN, S. **Chemistry of Coffee**. Elsevier Inc., 2013.

OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S.; MENDONÇA, J. C. F.; BARROS-JÚNIOR, M. C. Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 235–239, 2006.

PATRIGNANI, F.; CHINNICI, F.; SERRAZANETTI, D. I.; et al. Production of volatile and sulfur compounds by 10 *Saccharomyces cerevisiae* strains inoculated in trebbiano must. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 1–11, 2016.

PEREIRA, G. V. M.; CARVALHO NETO, D. P.; JÚNIOR, A. I. M.; et al. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. **Food Chemistry**, v. 272, p. 441–452, 2019. Elsevier.

PEREIRA, G. V. DE M.; SOCCOL, V. T.; BRAR, S. K.; NETO, E.; SOCCOL, C. R. Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2775–2788, 2017.

PEREIRA, GILBERTO VINÍCIUS MELO; CARVALHO NETO, D. P.; MEDEIROS, A. B. P.; et al. Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 7, p. 1689–1695, 2016.

PEREIRA, G V MELO; BEUX, M.; PAGNONCELLI, M. G. B.; et al. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 96–101, 2016.

PEREIRA, G. V. M.; NETO, E.; SOCCOL, V. T.; et al. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. **Food Research International**, v. 75, p. 348–356, 2015. Elsevier Ltd.

PEDERSON, C. S.; BREED, R. S. Fermentation of coffee. **Food Research**, v. 11, p. 99–100, 1946.

PLESSAS, S.; BEKATOROU, A.; GALLANAGH, J.; et al. Evolution of aroma volatiles during storage of sourdough breads made by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* or *Lactobacillus helveticus*. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 883–889, 2008.

RANTSIOU, K.; DOLCI, P.; GIACOSA, S.; et al. *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1987–94, 2012. American Society for Microbiology.

RANTSIOU, K.; DOLCI, P.; GIACOSA, S.; TORCHIO, F.; TOFALO, R.; TORRIANI, S.; SUZZI, G.; ROLLE, L.; COCOLIN, L. *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78, 1987–1994.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F. R.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 165–177, 2010.

SALVETTI, E.; TORRIANI, S.; FELIS, G. E. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 4, p. 217–226, 2012.

SÁNCHEZ, C.; NEVES, A. R.; CAVALHEIRO, J.; et al. Contribution of Citrate Metabolism to the Growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at Low pH. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 1136–1144, 2007.

SILVA, C. F.; VILELA, D. M.; DE SOUZA CORDEIRO, CECÍLIA; et al. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 235–247, 2013.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 951–957, 2008.

SUN, S. Y.; GONG, H. S.; ZHAO, K.; et al. Co-inoculation of yeast and lactic acid bacteria to improve cherry wines sensory quality. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 9, p. 1783–1790, 2013.

SMIT, B. A.; VLIEG, J. E. T. V. H.; ENGELS, W. J. M.; et al. Identification, cloning, and characterization of a *Lactococcus lactis* branched-chain α -keto acid decarboxylase involved in

- flavor formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 303–311, 2005.
- SNOEP, J. L.; DE MATTOS, M. J. T.; STARRENBURG, M. J. C.; HUGENHOLTZ, J. Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and α -acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4838–4841, 1992.
- STEINKRAUS, K. H. **Industrialization of indigenous fermented foods**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2004.
- TOCI, A. T.; FARAH, A. Volatile fingerprint of Brazilian defective coffee seeds: Corroboration of potential marker compounds and identification of new low quality indicators. **Food Chemistry**, v. 153, p. 298–314, 2014. Elsevier Ltd.
- TOLEDO, P. R. A. B.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R.; TOCI, A. T. Relationship Between the Different Aspects Related to Coffee Quality and Their Volatile Compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 705–719, 2016.
- VERMEULEN, N.; GÁNZLE, M. G.; VOGEL, R. F. Influence of peptide supply and cosubstrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3832–3839, 2006.
- VELMOUROUGANE, K. Impact of natural fermentation on physicochemical, microbiological and cup quality characteristics of Arabica and Robusta coffee. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 83, n. 2, 2013.
- WANG, C.; SUN, J.; LASSABLIERE, B.; et al. Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: Fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 409–420, 2019.
- WILSON, A. P.; WILSON, N. L. W. The economics of quality in the specialty coffee industry: Insights from the cup of excellence auction programs. **Agricultural Economics**, v. 45, n. S1, p. 91–105, 2014.
- XIA, X.; LUO, Y.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; ZHANG, B. Mixed starter culture regulates biogenic amines formation via decarboxylation and transamination during Chinese rice wine fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 25, p. 6348–6356, 2018. research-article, American Chemical Society.
- YERETZIAN, C.; JORDAN, A.; LINDINGER, W. Analysing the headspace of coffee by proton-transfer-reaction mass-spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 223–224, p. 115–139, 2003.
- YVON, M.; RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4–7, p. 185–201, 2001.
- ZHANG, S. J.; DE BRUYN, F.; POTHAKOS, V.; et al. Following coffee production from cherries to cup: Microbiological and metabolomic analysis of wet processing of *coffea arabica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 6, p. 1–22, 2019.

